

**Charakterisierung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese
am Modellorganismus *Ustilago maydis***

und

**Identifizierung von Wirtsspezifitätsfaktoren in
den phytopathogenen Brandpilzen
Ustilago maydis und *Sporisorium reilianum***



DISSERTATION

**zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Katja Zuther
aus Osnabrück

Marburg/Lahn, 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Anfang August 2005 bis März 2009 unter der Betreuung von Herrn Dr. Jan Schirawski in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Zuther, K., Mayser, P., Hettwer, U., Wu, W., Spiteller, P., Kindler, B.L., Karlovsky, P., Basse, C.W., und Schirawski, J. (2008). The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol 68, 152-172.

Vom Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 08.07.2009

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker
Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2009

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese
am Modellorganismus *Ustilago maydis*
und
Identifizierung von Wirtsspezifitätsfaktoren in den phytopathogenen Brandpilzen
Ustilago maydis und *Sporisorium reilianum*“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als
der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen
Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, Juni 2009

Katja Zuther

I Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Modellorganismus *Ustilago maydis* der Tryptophan-abhängige Biosyntheseweg untersucht, der zur Generierung von Indolpigmenten mit biologischen Effekten führt, die erstmals für den Pityriasis versicolor-assoziierten Hautpilz *Malassezia furfur* nachgewiesen worden waren. Mittels eines revers-genetischen Ansatzes konnte gezeigt werden, dass die Tryptophan-Aminotransferase Tam1 das einzige für die Pigmentbiosynthese verantwortliche Enzym repräsentiert. Die aufgereinigte heterolog exprimierte Tam1 aus *U. maydis* katalysierte die Umsetzung von Tryptophan und Phenylpyruvat zu Indolpyruvat und Phenylalanin. Ein im Vorfeld der Arbeit durchgeführter vorwärts-genetischer Ansatz hatte zur Identifikation von Mutanten geführt, die unfähig waren, in Anwesenheit von Tryptophan Pigmente zu bilden. Diese Mutanten waren in dem Sulfitreduktase-Gen *sir1* betroffen. In vitro-Experimente mit aufgereinigter Tam1 zeigten, dass auch 2-Oxo-4-Methylthiobutanoat, die 2-Oxosäure von Methionin, als Substrat für Tam1 dienen kann, was die Tryptophan-Deaminierung an den Schwefelmetabolismus koppelt. Die Experimente zeigten, dass Indolpyruvat spontan, entweder alleine oder in Kombination mit Tryptophan, in wässriger Umgebung zu einer Vielzahl von farbigen Substanzen reagierte, unter denen sich auch mindestens vier der für *M. furfur* beschriebenen Substanzen mit biologischen Effekten befanden. Experimente an Keratinozyten-Zellkultur zeigten, dass Indolpyruvatabhängige biologische Effekte wie vermindertes Proliferationsvermögen über den humanen Arylhydrocarbonrezeptor vermittelt werden könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mittels Genomvergleich Gene aus *Sporisorium reilianum* identifiziert, die an der Ausprägung der Wirtsspezifität beteiligt sein könnten. *S. reilianum* existiert in zwei Varietäten (SRM und SRH), wovon SRM bevorzugt auf Mais und SRH ausschließlich auf Hirse zur Sporenbildung kommt. Um Faktoren aus *S. reilianum* zu identifizieren, die die Virulenz auf Mais unterstützen und gleichzeitig die Virulenz auf anderen Wirtspflanzen schwächen, wurden die in den Genomen der Maispathogene SRM und *U. maydis* vorkommenden Gene nach Abwesenheit in den Genomen verwandter Pathogenen anderer Wirtspflanzen untersucht. Dabei wurde ein Gen aus *S. reilianum* identifiziert, *sr13864*, das vermutlich für ein sekretiertes Protein kodiert. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass *sr13864* während der biotrophen Phase exprimiert wird. *U. maydis*-Stämme, in denen das homologe Gen von *sr13864*, *um00823*, deletiert wurde, zeigten reduzierte Virulenz auf Mais. Während Expression von *um00823* in der *um00823*-Deletionsmutante den Virulenzdefekt vollständig komplementieren konnte, konnte heterologe Expression von *sr13864* in der *um00823*-Deletionsmutante die reduzierte Virulenz nur teilweise aufheben. Expression von *sr13864* in SRH führte zu einer erhöhten Abwehrreaktion auf Hirse in Form von roten Läsionen entlang der Leitbündel, die wahrscheinlich auf die Bildung von 3-Desoyanthocyanidin-Phytoalexin zurückzuführen sind. Damit scheint *sr13864* ein Wirtsspezifitätsfaktor mit gleichzeitiger Virulenzfunktion für die Infektion von Mais und Avirulenzfunktion für die Infektion von Hirse zu sein.

II Abkürzungen und Fachbegriffe

AB	Antibiotikum	EtBr	Ethidiumbromid
Abb.	Abbildung	FKS	Fötale Kälberserum
Amp	Ampicillin	g	Gramm
ATP	Adenosintriphosphat	x g	Erdbeschleunigung
bp	Basenpaare	h	Stunde
BSA	Rinderserumalbumin	H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Bq	Bequerel	HRP	„horse radish peroxidase“
bzw.	beziehungsweise	Hrsg	Herausgeber
°C	Grad Celsius	Hyg	Hygromycin
ca.	circa	IP	Indolpyruvat
Cbx	Carboxin	IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
cDNA	komplementäre DNA	kb	Kilobasenpaare
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	kD	Kilodalton
CM	“complete medium”	l	Liter
cpm	„counts per minute“ (Zählrate)	LB	Luria-Bertani
C-Terminus	Carboxy-Terminus	M	Molarität
CTP	Cytidin-5'-triphosphat	m-	milli- (1x10 ⁻³)
d	Tag	μ-	mikro- (1x10 ⁻⁶)
d. h.	das heißt	MA	Malasseziazol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	Mb	Megabasenpaare
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	MCS	“Multiple Cloning Site”
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	MI	Malasseziaindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat	min	Minute
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	MM	Minimalmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	n-	nano- (1x10 ⁻⁹)
DNase	Desoxyribonuklease	NAT	Nourseothricin
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate	N-terminus	Amino-Terminus
DTT	Dithiothreitol	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	2-OG	2-Oxoglutarat
E. coli	Escherichia coli	OMBA	Oxomethylthiobutyrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ORF	„open reading frame“
et al.	et alteres	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCit	Pityriacitrin
PyA	Pityriarubin A
PyB	Pityriarubin B
PyC	Pityriarubin C
PyAn	Pityriarubinanhydrid
PCR	„Polymerase chain reaction“
PD	„potato dextrose“
PEG	Polyethylenglycol
PPy	Phenylpyruvat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S (IUB Ambiguity Code)	Guanin, Cytosin
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„standard saline citrat“ (-Puffer)
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TBS	Tris „buffered“ saline
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T _m	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolettes Licht
V (IUB Ambiguity code)	Guanin, Cytosin, Adenin

V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galactosid
YEPS	„yeast extract + peptone+sucrose“
z. A.	zum Anteil
z. B.	zum Beispiel

Code der Nukleinsäuren

A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin
U	Uracil

Code der Aminosäuren

A (Ala) Alanin	M (Met) Methionin
C (Cys) Cystein	N (Asp) Asparagin
D (Asn) Asparaginsäure	P (Pro) Prolin
E (Gln) Glutaminsäure	Q (Glu) Glutamin
F (Phe) Phenylalanin	R (Arg) Arginin
G (Gly) Glycin	S (Ser) Serin
H (His) Histidin	T (Thr) Threonin
I (Ile) Isoleucin	V (Val) Valin
K (Lys) Lysin	W (Trp) Tryptophan
L (Leu) Leucin	Y (Tyr) Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	I
II Abkürzungen und Fachbegriffe	II
1 Einleitung Teil 1.....	1
1.1 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite.....	1
1.1.1 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Prokaryoten.....	1
1.1.2 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Eukaryoten.....	3
1.2 Tryptophanabhängige Pigmente in <i>M. furfur</i> und der mögliche Zusammenhang mit der Hautkrankheit Pityriasis versicolor	9
1.3 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus zur Aufklärung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese.....	10
1.4 Identifizierung von <i>U. maydis</i>-Mutanten, die unfähig sind, in Anwesenheit von Tryptophan Pigment zu bilden	11
1.5 Ziele der Arbeit	12
2 Ergebnisse Teil 1.....	13
2.1 Identifizierung von Punktmutationen in den <i>U. maydis</i>-Mutanten, die unfähig sind, in Anwesenheit von Tryptophan Pigment zu bilden	13
2.2 Identifizierung eines für die Pigmentsynthese verantwortlichen Gens durch reverse Genetik.....	16
2.3 Tam1 koppelt die Trp-Deaminierung an die Aminierung von Phenylpyruvat und 2-Oxo-4-Methylthiobutyrat	18
2.4 Biochemische Charakterisierung von Tam1	21
2.5 Die Deletion von Tam1 hat keinen Effekt auf die Virulenz von <i>U. maydis</i>	24
2.6 Pigmente werden spontan aus IP und Trp gebildet.....	25
2.7 Effekte der Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf HaCaT-Zelllinien.....	27
2.7.1 Einfluss von Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf die Entzündungsreaktion in HaCaT-Zellen.....	29
2.7.2 Einfluss der Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf die Überlebensrate von HaCaT-Zellen	32
2.7.3 Einfluss der Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf die Überlebensrate von <i>U. maydis</i>	33
3 Diskussion Teil 1	35
3.1 Wie könnte der Mechanismus aussehen, der zur spontanen Bildung der Pigmente aus IP führt?.....	35
3.2 Warum unterscheiden sich die Pigmentprofile von <i>M. furfur</i> und <i>U. maydis</i>, wenn die meisten Pigmente spontan aus IP generiert werden?	37
3.3 Warum ist die sir1Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹-Mutante in der Pigmentbildung auf Trp beeinträchtigt?	37
3.4 Könnten die IP-generierten Substanzen als Arylhydrocarbon-Rezeptor-Agonisten Symptome der Pityriasis versicolor erklären?	39
3.5 Können biologisch aktive Sekundärmetabolite spontan aus IP gebildet werden?.....	42

4	Einleitung Teil 2.....	45
4.1	Wirtsspezifität in phytopathogenen Pilzen	45
4.1.1	Wirtsspezifität durch wirtsselektive Toxine	46
4.1.2	Wirtsspezifität durch Detoxifizierungsstrategien	46
4.1.3	Geringe Wirtsspezifität durch Induktion eines Pflanzen-generierten oxidativen „Burst“	47
4.1.4	Wirtsspezifität durch kleine sekretierte Proteine	48
4.1.5	Die sexuelle Entwicklung der Brandpilze ist eng an die Wirtspflanze gekoppelt	50
4.1.6	Die beiden <i>S. reilianum</i> -Varietäten SRM und SRH als Modellsystem zur Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren in biotrophen Pilzen	52
5	Ergebnisse Teil 2.....	55
5.1	Mikroskopischer Vergleich der Infektion von Hirse mit dem <i>S. reilianum</i> Hirseisolat und dem <i>S. reilianum</i> Maisisolat.....	55
5.2	Analysen zur Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren für Mais in <i>Sporisorium reilianum</i>	56
5.3	Vergleich der Genomsequenzen der <i>S. reilianum</i> -Stämme 5-1 (Maisisolat) und H2-8 (Hirseisolat)	58
5.3.1	Vergleich der Aminosäure- und DNA-Sequenzen von um00823 und sr13864.....	60
5.3.2	Deletion von um00823 in <i>U. maydis</i> führt zu einer Virulenzreduktion.....	62
5.3.3	<i>Sr13864</i> kann den Virulenzdefekt der SG200Δum00823#9-Mutante teilweise aufheben.....	63
5.3.4	Expression von <i>sr13864</i> im <i>S. reilianum</i> Hirseisolat führt zur Virulenzhöhung auf Mais.....	65
5.3.5	Expression von <i>sr13864</i> im <i>S. reilianum</i> Hirseisolat führt zur Bildung von roten Läsionen nach Infektion von Hirse	67
5.3.6	Expression von <i>sr13864</i> im <i>S. reilianum</i> -Hirseisolat führt zu einer geringen Virulenzerniedrigung.....	68
5.3.7	SRM auf Hirse löst eine besonders starke Bildung roter Läsionen aus.	69
6	Diskussion Teil 2	72
6.1	Gibt es nur einen Wirtsspezifitätsfaktor in <i>S. reilianum</i> ?	72
6.2	Kodiert <i>sr13864</i> für ein sekretiertes Protein?	75
6.3	Dient Phytoalexinbildung in Hirse als Abwehr einer SRM-Infektion?	77
6.4	Welche Rolle spielen die Leitgewebe bei Infektion und Abwehr von <i>S. reilianum</i> und wie wichtig sind sie für die Pathogenabwehr?.....	78
6.5	Ist <i>sr13864</i> ein gewebespezifischer Avirulenzfaktor für Hirse?	80
6.6	Evolution von Effektorgenen	83
7	Material und Methoden	85
7.1	Material.....	85
7.1.1	Chemikalien.....	85
7.1.2	Kits	87
7.1.3	Enzyme und Proteine.....	87
7.1.4	Sonstige Materialien.....	88
7.1.5	Puffer und Lösungen	88
7.1.6	Größenstandards.....	91
7.1.7	Oligonukleotide	91
7.1.8	Plasmide und Konstrukte.....	93
7.1.9	<i>E.coli</i> -Stämme	95
7.1.10	<i>U. maydis</i> Stämme.....	95
7.1.11	<i>S. reilianum</i> -Stämme	96

7.1.12	Maisvarietäten (<i>Zea mays</i> , spec.)	96
7.1.13	Hirsevarietäten.....	96
7.1.14	Zelllinie	97
7.1.15	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	97
7.1.16	Medien zur Kultivierung von <i>U. maydis</i>	97
7.1.17	Medien zur Kultivierung von <i>S. reilianum</i>	98
7.1.18	Medien zur Kultivierung von <i>M. furfur</i>	98
7.1.19	Medien zur Kultivierung von HaCaT-Zellen.....	99
7.2	Methoden	99
7.2.1	Anzucht von Mikroorganismen	99
7.2.2	Kultivierung von HaCaT-Zellen.....	100
7.2.3	DNA-Präparationen.....	101
7.2.4	Amplifikation und Klonierung von DNA.....	102
7.2.5	Analyse von DNA	104
7.2.6	Nachweis von Nukleinsäuren	105
7.2.7	Präparation von RNA	106
7.2.8	cDNA-Synthese	106
7.2.9	Transformationen	106
7.2.10	Proteinbiochemische Methoden	108
7.2.11	Untersuchung von <i>U. maydis</i> und <i>S. reilianum</i>	109
7.2.12	UV-Mutagenese und Komplementation	110
7.2.13	Pigmentinduktion	111
7.2.14	Pigmentgewinnung und Aufreinigung.....	112
7.2.15	Fütterungsexperimente	115
7.2.16	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	116
7.2.17	Komplementation von 521sir1Δ ^{1054–1499} durch Phenylpyruvat.....	116
7.2.18	Tam1-Überexpression und Aufreinigung.....	116
7.2.19	Tam1-Enzymaktivitätsexperimente	117
7.2.20	Untersuchungen an HaCaT-Zellen zur Analyse des Effekts von Indolpyruvat	118
7.2.21	UV-Bestrahlungsexperimente mit <i>U. maydis</i> -Zellen.....	119
8	Literatur	120

1 Einleitung Teil 1

1.1 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite

Die Aminosäure Tryptophan (Trp; Abb. 1) dient als Vorläufer für viele Sekundärmetabolite mit unterschiedlichen biologischen Effekten. Trp-abhängige Sekundärmetabolite werden von Prokaryoten und Eukaryoten (Insekten, Pflanzen und Pilze) gebildet. Für einige dieser Sekundärmetabolite sind die Biosynthesewege ganz oder teilweise aufgeklärt.

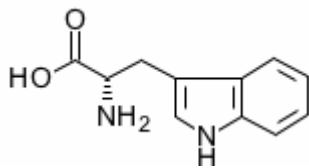


Abb. 1. Aminosäure Tryptophan

1.1.1 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Prokaryoten

Sehr bekannte und industriell relevante Trp-Derivate sind die Pigmente Indigo und sein Strukturisomeres Indirubin (Russel und Kaupp, 1969; Abb. 2). Neben der industriellen Synthese wird Indigo auch von Bakterien synthetisiert, dabei vorwiegend von *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas mendocina*, die in der Lage sind, aromatische Kohlenwasserstoffe zu degradieren (Yen et al., 1991; Murdock et al., 1993; Eaton und Chapman, 1995; O'Connor et al., 1997; O'Connor und Hartmans, 1998). Das für die Generierung von Indigo verantwortliche Enzym-System besteht aus einem oder mehreren Enzymen, typischerweise Monooxygenasen, Dioxygenasen oder Hydroxylasen (Doukyu et al., 1998). Diese Enzyme stellen aus Indol Indoxyl her, welches dann – ausschließlich durch spontane Prozesse – zu Indigo oder Indirubin dimerisiert (Drewlo et al., 2001).

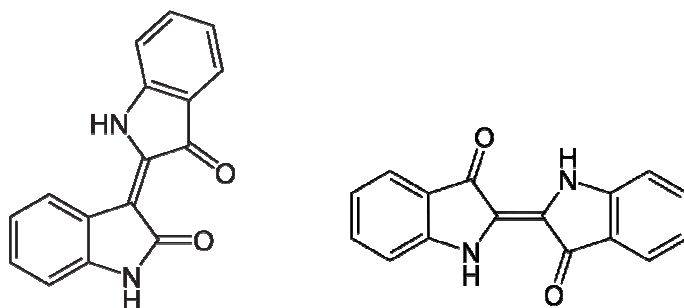


Abb. 2. Strukturformeln der beiden Strukturisomere Indirubin (links) und Indigo (rechts).

Violacein ist ein wasserunlösliches, violettfarbenes Pigment, welches aus dem gram-negativen Bakterium *Chromobacterium violaceum* extrahiert wurde. Es zeigt bakterizide,

tumorizide, trypanozide und anti-leishmanien Aktivitäten (Balibar und Walsh, 2006; Lopes, 2009). Die Biosynthese von Violacein beginnt mit der oxidativen Deaminierung von Trp-Molekülen, katalysiert durch die Trp-Oxidase VioA (Abb. 3A). Die entstehende Indolbrenztraubensäure (IPA) wird dann dimerisiert, wahrscheinlich von der Häm-enthaltenden Oxidase VioB (Pemberton et al., 1991; Balibar und Walsh, 2006). Das dabei kurzzeitig entstehende Intermediat konnte bisher nicht charakterisiert werden. Die Anwesenheit des kürzlich charakterisierten molekularen Chaperons VioE führt dazu, dass dieses Intermediat sofort zu Prodeoxyviolacein umgesetzt wird, welches dann mittels VioC und VioD zu Violacein umgesetzt wird (Ryan et al., 2008). Die Abwesenheit von VioE führt zur spontanen Bildung von Chrompyrrolsäure (CPA; Abb. 3A), einem Vorläufer von anderen Sekundärmetaboliten, darunter den Substanzen Rebeccamycin und Staurosporin (Abb. 3B). Rebeccamycin und Staurosporin sind Substanzen mit antitumorigenen Effekten, die aus verschiedenen Actinomyceten isoliert worden sind (Sanchez et al., 2006; Wang et al., 2009). Tatsächlich besitzen auch Rebeccamycin- und Staurosporin-produzierende Actinomyceten Proteine, die zu VioA bzw. VioB homolog sind. Diese Proteine wurden RebO und RebD für Rebeccamycin-produzierende Mikroorganismen und StaO und StaD für Staurosporin-produzierende Mikroorganismen genannt (Sanchez et al., 2006; Howard-Jones et al., 2006). Während StaO direkt Trp als Substrat benutzt, so ist das Substrat von RebO 7-Chloro-Trp, welches durch enzymatische Aktivität von RebH aus Trp entsteht (Nishizawa et al., 2006; Abb. 3B). Mittels oxidativer Umsetzung von 7-Chloro-Trp/ Trp zum 7-Chloro-IPA-Imin/ IPA-Imin von RebO/ StaO entsteht durch Dimerisierung wahrscheinlich vermittelt durch StaD/ RebD ein unbekanntes Intermediat, welches dann spontan zu dichlorinierter CPA/ CPA weiter reagiert. Die dichlorinierte CPA/ CPA wird dann von einem Cytochrom-P450-Enzym StaP/ RebP so transformiert, dass es zu einem Ringschluss durch eine Aryl-Aryl-Verknüpfung kommt. Die Monooxygenase RebC/StaC ist notwendig für die effiziente Umwandlung in Dichloro-Arcyriaflavin/K252c (Sanchez et al., 2005). Weitere Schritte werden von RebG und RebM zur Synthese von Rebeccamycin bzw. von StaG, StaN, StaMA und StaMB zur Synthese von Staurosporin vermittelt (Sanchez et al., 2005; Abb. 3B).

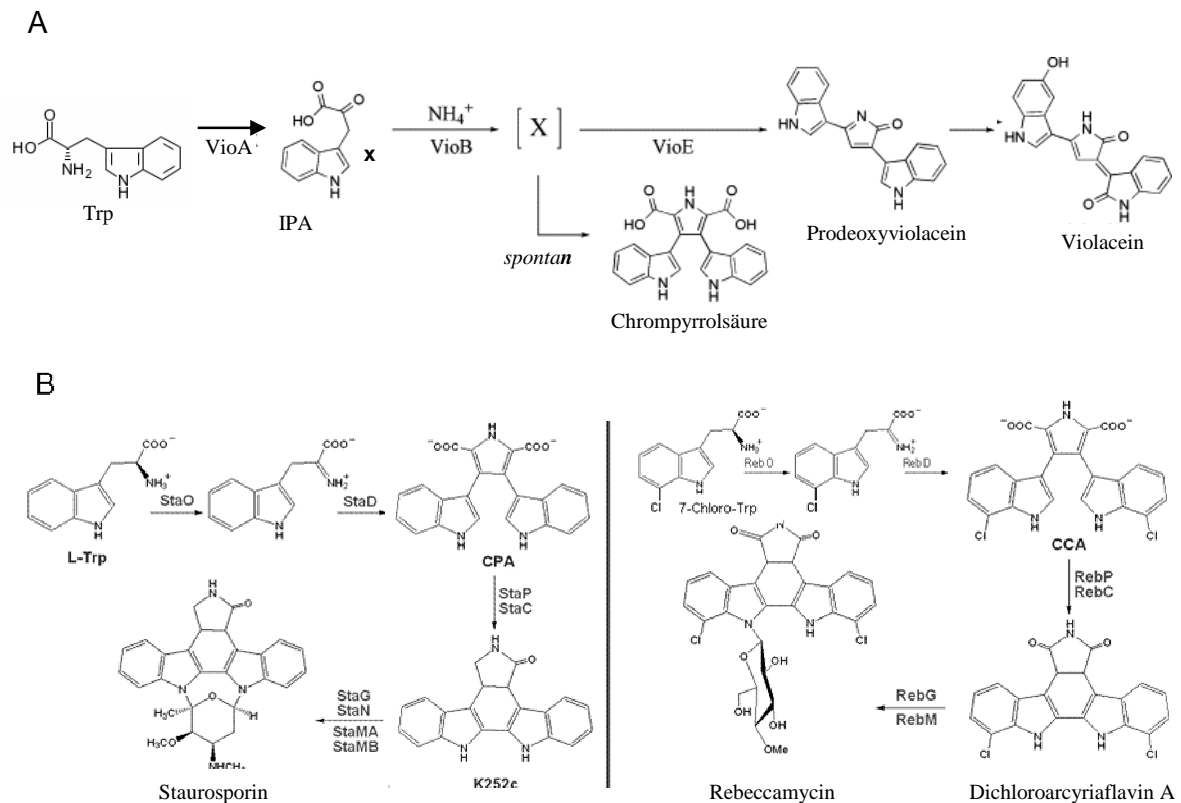


Abb. 3. Trp-abhängige Biosynthese von Violacein, Staurosporin und Rebeccamycin. A. Violacein-Biosynthese in *Chromobacterium violaceum* und Spontansynthese des Nebenprodukts Chromopyrrolsäure, welches in verschiedenen Actinomyceten (B) als Vorläufer für Staurosporin (links) und Rebeccamycin (rechts) fungiert (Abbildung modifiziert nach Asamizu et al., 2007 und Wang et al., 2009).

1.1.2 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Eukaryoten

1.1.2.1 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Insekten

Ommochrome sind Trp-abhängige Pigmente, die die Augenfarbe aber auch die Farbe der Kutikula (Insausti und Casas, 2008) von Insekten, Krebsen, Spinnen und Kopffüßern bestimmen (Oxford und Gillespie, 1998). Bekannt geworden ist der Biosyntheseweg von Xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. Dabei wird Trp mittels Trp-Pyrrolase zu N-Formylkynurenin umgesetzt (Abb. 4). Eine Formamidase setzt N-Formylkynurenin zu Kynurenin um. Ein wichtiges Enzym ist dann die Kynurenin-3-Hydroxylase, die die Umsetzung von Kynurenin zu 3-Hydroxykynurenin katalysiert. Zwei Moleküle 3-Hydroxykynurenin reagieren durch Katalyse mittels Phenoxazinon-Synthase zu Xanthommatin.

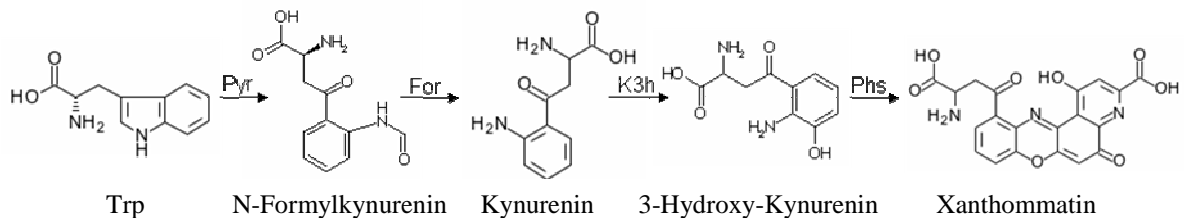


Abb. 4. Biosyntheseweg von Xanthommatin aus Tryptophan. Pyr: Pyrrolase, For: Formamidase, K3h: Kynurenin-3-Hydroxylase, Phs: Phenoxazin-Synthase (Abbildung erstellt nach Summers et al., 1978).

1.1.2.2 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Pflanzen

Indolessigsäure aus *Arabidopsis thaliana*

Das Pflanzen-Wachstumshormon Indol-3-Essigsäure (IAA) ist das am häufigsten vorkommende natürliche Auxin. IAA kann über Trp-unabhängige und Trp-abhängige Prozesse gebildet werden (Zhang et al., 2008). Es gibt viele Pflanzen-Enzyme, die IAA de novo synthetisieren können, und einige, die IAA aus Konjugaten herauslösen können (Vogler und Kuhlemeier, 2003). Als Bestandteil eines Trp-unabhängigen Synthesewegs ist für *Arabidopsis thaliana* die Indol-Synthase beschrieben, die Indol-3-Glycerin-Phosphat (IGP) zu Indol umsetzt, welches direkt zu IAA und weiteren Sekundärmetaboliten umgesetzt werden kann (Zhang et al., 2008). Mehrere Wege sind für die Trp-abhängige Synthese von IAA bekannt (Teale et al., 2006). Trp kann entweder zu Tryptamin decarboxyliert und im Folgenden zu Indolacetaldoxim (IAOx), oder direkt zu IAOx mittels Cytochrom-P450-Enzym umgesetzt werden. IAOx stellt entweder durch das Intermediat Indol-3-Acetonitril oder durch Indolacetaldehyd (IAAld) einen potentiellen Vorläufer von IAA dar. In einem davon unabhängigen Weg kann Trp zu Indolpyruvat (IP) deaminiert werden, um dann über IAAld zu IAA oxidiert zu werden (Übersichtsartikel von Ljung et al., 2002; Woodward und Bartel, 2005). Weiterhin ist bekannt, dass IP auch spontan zur Generierung von IAA reagieren kann (Basse et al., 1996). IP wird aus Trp mittels Tryptophan-Aminotransferase TAA1 generiert (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008). TAA1 wird z. B. als Antwort auf Umweltreize wie Schatten (Tao et al., 2008) oder auch als Faktor in der Pflanzenentwicklung (Stepanova et al., 2008) aktiviert. Dieser Weg dient vor allem der schnellen und ortsspezifischen Anreicherung von IAA (Strader und Bartel, 2008; Palme und Nagy, 2008).

Camalexin aus *A. thaliana*

Phytoalexine sind antibiotische Substanzen, die von vielen Pflanzen als Antwort auf Pathogenbefall produziert werden (Pedras et al., 2000). Phytoalexine sind aromatische Verbindungen, die aus Trp oder Trp-Vorläufern gebildet werden könnten. Das für *A. thaliana* typische Phytoalexin ist Camalexin (Abb. 5A). Camalexin-Synthese korreliert mit der Hochregulierung von Genen aus dem Trp-Biosyntheseweg (Zhao und Last, 1996), was einen

Zusammenhang zwischen Camalexin und Trp-Biosyntheseweg vermuten lässt. Markierungsexperimente mit markiertem Trp und markiertem Anthranilat – einem Intermediat aus dem Trp-Biosyntheseweg – ließen darauf schließen, dass Anthranilat ein wahrscheinlicherer Vorläufer von Camalexin ist (Tsuji et al., 1993; Zook and Hammerschmidt, 1997; Zook, 1998; Abb. 5B). Neuere Erkenntnisse deuten jedoch auf Trp als Vorläufer hin, welches durch die beiden Monooxygenasen CYP79B2 und CYP79B3 zu Indol-3-acetaldoxim (IAOx) umgesetzt wird und dann über teilweise unbekannte Zwischenschritte mittels der Decarboxylase CYP71B15 zu Camalexin umgesetzt wird (Glawischnig et al., 2004; Schuegger et al., 2006; Abb. 5A).

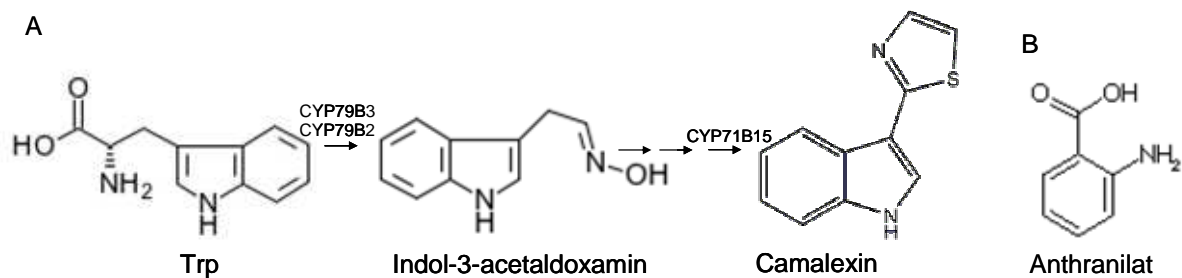


Abb. 5. A. Biosynthese des Phytoalexins Camalexin mit Trp als möglichem Vorläufer aus *A. thaliana*. B. Strukturformel von Anthranilat, ein Vorläufer von Trp.

1.1.2.3 Tryptophanabhängige Sekundärmetabolite in Pilzen

Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea*

Claviceps purpurea ist bekannt für die Synthese der Mutterkornalkaloide (Ergotalkaloide, EA). Das erste Enzym des EA-Biosynthese-Wegs von *C. purpurea* (Tudzynski et al., 2001) ist eine aromatische Prenyltransferase, die Dimethylallyltryptophan (DMAT)-Synthase, die die Bildung von DMAT aus Trp und Dimethylallylpyrophosphat (Tsai et al., 1995) katalysiert. Der zweite Schritt des EA-Wegs beinhaltet die N-Methylierung von DMAT zu Methyl-DMAT, welches im Folgenden Oxidations- und Reduktionsreaktionen unterworfen wird, wobei Chanoclavin, Agroclavin und Elymoclavin gebildet werden. Spontane Nebenreaktionen führen zur Generierung von zahlreichen weiteren Clavinen.

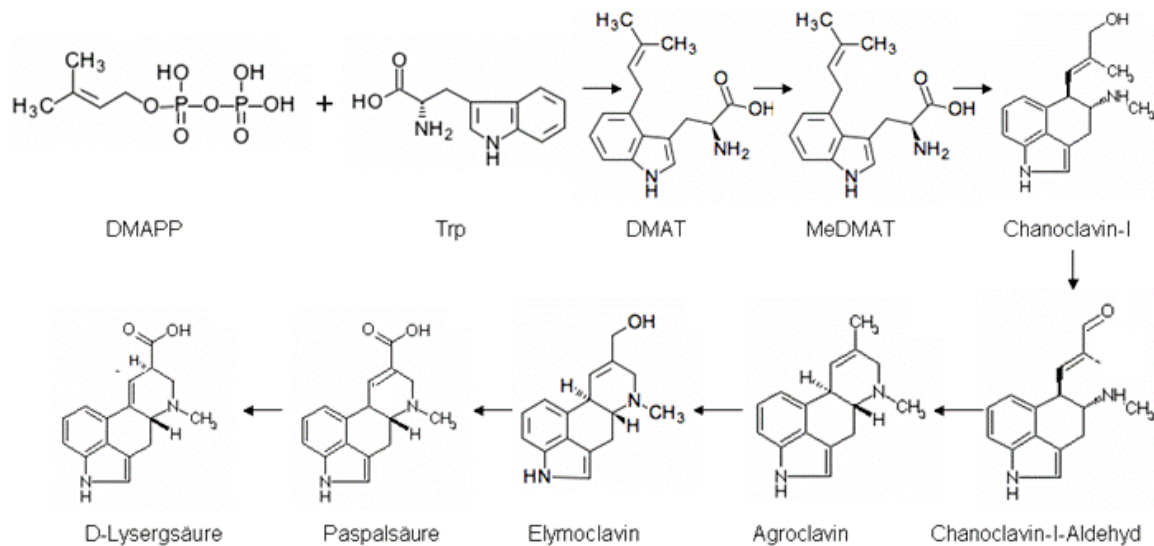


Abb. 6: Biosynthese von D-Lysergsäure, dem Vorläufermolekül der Ergopeptine (Abbildung modifiziert nach Tudzynski et al., 2001). DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat, DMAT: Dimethylallyltryptophan; MeDMAT: Methyldimethylallyltryptophan.

Elymoclavin wird zu Paspalsäure decarboxyliert, welches dann durch das Cytochrom-P450-Enzym CloA zu Lysergsäure oxidiert wird. Mittels einer ungewöhnlichen NRPS, einer Lyserg-Peptid-Synthetase (LPS) wird die Lysergsäure mit drei hydrophoben L-Aminosäuren verknüpft, um die Ergopeptine zu bilden. Das LPS-Modul, welches die drei Aminosäuren bindet, besitzt variable Sequenzen, welches zur Bindung von unterschiedlichen Aminosäuren führt. Damit werden vielfältige, unterschiedliche Ergopeptine sogar innerhalb derselben Spezies gewährleistet (Tudzynski et al., 2001).

Terrequinon aus *Aspergillus nidulans*

Der Biosyntheseweg von Terrequinon A weist Ähnlichkeit zu den Biosynthesewegen der Substanzen Violacein, Staurosporin und Rebeccamycin auf. Die fungizide und antitumorigene Substanz Terrequinon A wurde aus Extrakten von *Aspergillus terreus* und *Aspergillus nidulans* isoliert. Die Enzyme, die für die Generierung von Terrequinon A in *A. nidulans* verantwortlich sind, werden durch ein Gen-Cluster determiniert. Der erste Schritt besteht aus der von der Trp-Transaminase TdiD katalysierten Deaminierung von Trp zu Indolpyruvat (IPA), gefolgt von einer IPA-Dimerisierung durch die nichtribosomale Peptidsynthetase TdiA zu Didemethylasterriquinon D (Balibar et al., 2007; Schneider et al., 2007). Didemethylasterriquinon D wird durch ein Enzymsystem bestehend aus der Quinonoxido-reduktase TdiC, der Prenyltransferase TdiB und der Methyltransferase TdiE zu Terrequinon A umgesetzt (Balibar et al., 2007).

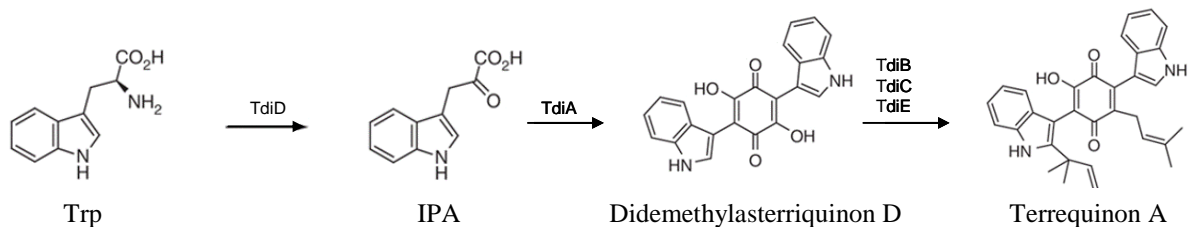


Abb. 7. Biosyntheseweg von Terrequinon aus Tryptophan. (Abbildung modifiziert nach Balibar et al., 2007)

IAA aus *Ustilago maydis*

Auch einige Pilze können IAA produzieren (Gruen, 1959). Die zugrunde liegenden biosynthetischen Mechanismen sind bisher aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Als pflanzenpathogener Pilz induziert *Ustilago maydis* Tumore auf seiner Wirtspflanze Mais. Tumorinduktion wurde mit IAA-Produktion in Verbindung gebracht (Wolf, 1952). Dabei könnte das Vermögen von *U. maydis*, IAA zu produzieren, eine Schlüsselrolle für die Tumorinduktion spielen.

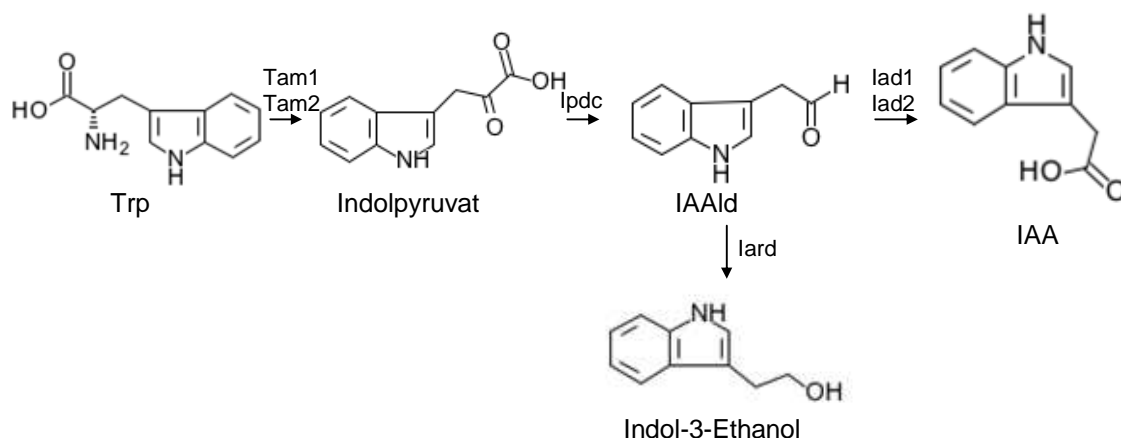


Abb. 8. Vorgeschlagener, möglicher IAA-Biosyntheseweg in *U. maydis* (Basse et al., 2008). IAAld: Indolacetaldehyd, IAA: Indolelessigsäure.

Fütterungsexperimente mit Indolacetaldehyd (IAAld) in *U. maydis* haben gezeigt, dass IAA aus IAAld durch die Aktivität der IAAld-Dehydrogenasen Iad1 und Iad2 entstehen kann (Reineke et al., 2008; Abb. 8). Die *U. maydis*Δ*iad1*Δ*iad2*-Stämme waren in ihrer Fähigkeit, IAA aus IAAld zu synthetisieren, vollständig inhibiert. Trp-Fütterungsexperimente mit den Δ*iad1*Δ*iad2*-Stämmen zeigten, dass im Vergleich zum *U. maydis*-Wildtyp 70% weniger IAA produziert wurde, was für einen zusätzlichen Tryptophan-abhängigen IAA-Syntheseweg sprach (Reineke et al., 2008). *U. maydis*Δ*tam1*-Mutanten, die zu fast 100% in ihrem Vermögen, Indolpyruvat herzustellen, beeinträchtigt waren (diese Arbeit), waren zu fast 90% in ihrem Vermögen, IAA zu synthetisieren, beeinträchtigt. Damit scheint der IAA-Hauptsyntheseweg über Indolpyruvat abzulaufen. Messungen des IAA-Gehalts in *U.*

maydis-infiziertem Tumorgewebe zeigten eine ca. 70%ige Reduktion des IAA- Gehalts bei Infektion mit dem *U. maydis* Δ *tam1*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch hatte der unterschiedliche IAA-Gehalt im Tumorgewebe keinen Einfluss auf die Tumorbildung (Reineke et al., 2008), weshalb die IAA-Bildung im Tumorgewebe zumindest nicht die einzige Ursache für die Tumorbildung sein kann. Weitere Wege, die zur IAA-Entstehung führen, könnten über Decarboxylierung von Trp zu Tryptamin ablaufen oder auch über spontane Prozesse von Indolpyruvat zu IAA (Basse et al., 1996).

Pigmente und Fluorochrome aus *Malassezia furfur*

Kürzlich wurde eine ganze Reihe weiterer Trp-generierter Stoffe isoliert, die eine Rolle in der mit *Malassezia furfur* assoziierten Hautkrankheit Pityriasis versicolor spielen könnten (Mayser et al., 2003; Irlinger et al., 2004; Krämer et al., 2005a; Machowinski et al., 2006). *Malassezia furfur* produziert in Abhängigkeit von Trp zahlreiche fluoreszierende und farbige Substanzen (Pigmente) (Mayser et al., 1998). Einige von ihnen wurden bereits aufgereinigt und die chemische Struktur bestimmt (Mayser et al., 2002; Mayser et al., 2003; Irlinger et al., 2005; Krämer et al., 2005a; Machowinski et al., 2006).

Für die Biosynthese der neuen Substanzen aus *M. furfur* wurde ein Triketon als Vorläufer-Molekül vorgeschlagen. 4,5-Bis-(1H-Indol-3-yl)-Cyclopent-4-en-1,2,3-Trion könnte sich durch die Kondensation von zwei IP-Molekülen bilden (Irlinger et al., 2004). Dieser Vorläufer könnte entweder mit Trp reagieren, was in der Bildung von Pityriaanhydrid (PitA) resultieren würde oder mit Indolpyruvamid oder den jeweiligen Carboxyl-Säuren reagieren, um Pityriarubin B (PitB) oder Pityriarubin C (PitC) entstehen zu lassen (Irlinger et al., 2004, Abb. 9). Für die Biosynthese von Pityriarubin A (PyA) und Pityrialacton aus dem hypothetischen Triketon-Intermediat wurden einige Oxidations-und Decarboxylierungsreaktionen vorgeschlagen (Irlinger et al., 2004). Durch C¹³-Trp-Fütterungsexperimente wurde gezeigt, dass die Spiro-Kohlenstoff-Atome der Pityriarubine von der Carboxy-Gruppe des Trp stammen, wobei die Carboxy-Gruppe des zweiten Trp abgespalten wird, was eine Decarboxylierungsreaktion vermuten lässt (Irlinger et al., 2004).

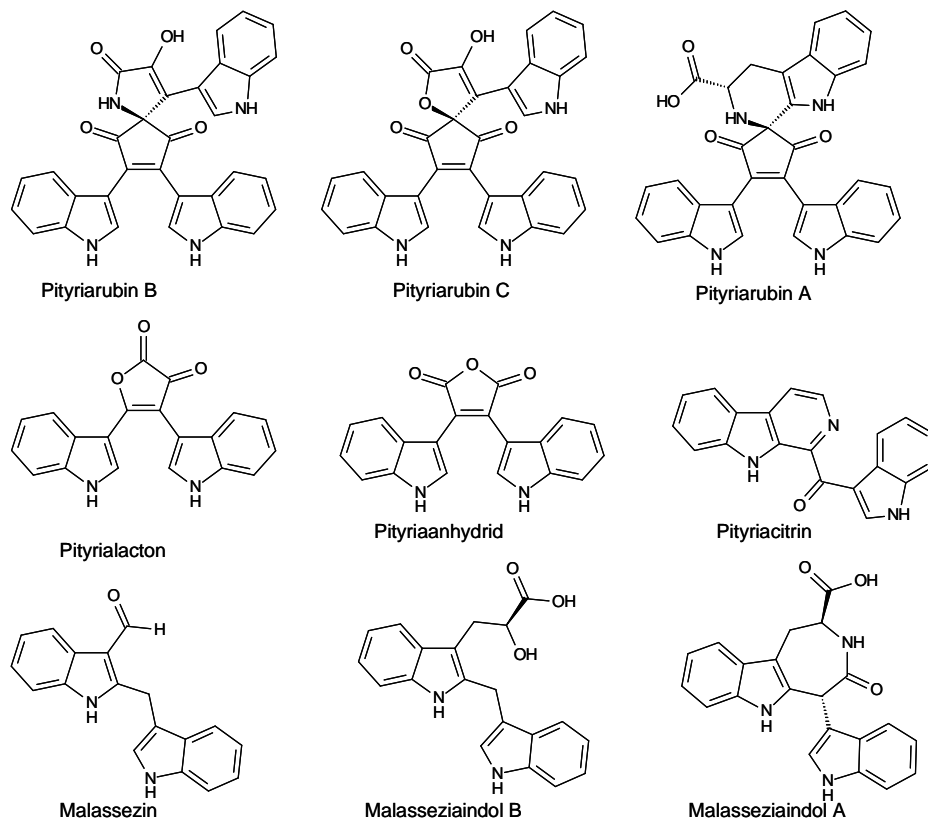


Abb. 9: Strukturformeln ausgewählter Substanzen, die von *M. furfur* aus Trp generiert werden.

1.2 Tryptophanabhängige Pigmente in *M. furfur* und der mögliche Zusammenhang mit der Hautkrankheit Pityriasis versicolor

M. furfur kommt natürlicherweise auf menschlicher Haut vor und ist in die Hautkrankheit Pityriasis versicolor involviert. Charakteristisch für die Krankheit sind hyper- und hypopigmentierte Läsionen, die kaum Entzündungszeichen zeigen (Charles et al., 1973; Gupta et al., 2003). Diese Läsionen zeigen unter UV-Licht charakteristische gelb-grünliche Fluoreszenz, die für die Diagnostik genutzt werden kann (Thoma et al., 2005). Während die Pilzinfektion selbst effizient mit Antimykotika behandelt werden kann, persistiert die assoziierte Hypopigmentierung gewöhnlich für einige Monate (Thoma et al., 2005). Diese hypopigmentierten Hautareale zeigen gegenüber UV-Strahlung keine erhöhte Sensitivität. (Abb. 10, Larangeira de Almeida und Mayser, 2006). Dennoch scheinen diese Läsionen weniger Melanin zu enthalten, was sich sowohl mit der verringerten Größe und Aggregation von Melanosomen korrelieren lässt als auch mit der Plasmolyse von Melanozyten (Galadari et al., 1992).



Abb. 10. Weiße Läsionen der Pityriasis versicolor umgeben von Sonnenbrand-betroffener Haut. Abbildung aus Larangeira de Almeida und Mayser, 2007.

Die aus *M. furfur* isolierten Trp-abhängigen neuartigen Substanzen zeigen biologische Effekte, mit denen charakteristische Krankheitssymptome erklärt werden können. Pityriaanhydrid (PyA; Abb. 9) und die Pityriarubine A, B und C (PitA, PitB, PitC; Abb. 9) können in humanen Neutrophilen die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies unterdrücken, was möglicherweise die fehlenden Entzündungsanzeichen in den betroffenen Hautarealen erklären könnte (Krämer et al., 2005b). Pityriacitrin (PCit; Abb. 9) wurde als hochpotenter UV-Filter beschrieben (Mayser et al., 2002; Machowinski et al., 2006). Seine Präsenz könnte daher erklären, warum depigmentierte Hautareale vor Sonnenbrand geschützt sind. Neuere Experimente zeigten jedoch, dass Pityriacitrin nur ein sehr schwacher UV-Filter ist (Gambichler et al., 2007). Malassezin ist als ein neuer Aryl-Hydrocarbonrezeptor-Agonist (AhR) beschrieben, der Apoptose in menschlichen Melanozyten induziert und daher zur Entwicklung der charakteristischen depigmentierten Hautläsionen beitragen könnte (Krämer et al., 2005a). Pityrialacton ist ein Fluorochrom und könnte zur beobachteten Fluoreszenz der Pityriasis versicolor-Läsionen beitragen (Mayser et al., 2003). Kürzlich wurden Trp-Derivate mit identischer Struktur in Extrakten von auf Trp angezogenem *Candida glabrata* gefunden, was auf eine evolutionäre Konservierung der biosynthetischen Wege hindeutet (Mayser et al., 2007).

1.3 *Ustilago maydis* als Modellorganismus zur Aufklärung der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese

Die Untersuchung der biosynthetischen Wege und der Rolle der Trp-generierten Pigmente in der Pathogenese von *M. furfur* ist durch das Fehlen von Vektoren und einem Transformationssystem für *M. furfur* eingeschränkt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde getestet, ob sich der sequenzierte (Kämper et al., 2006) und genetisch zugängliche (Bölker et

al., 1995) Basidiomycet *U. maydis* als Modellorganismus zur Aufklärung der Pigmentbiosynthese eignet.

Experimente, die dieser Arbeit vorausgingen, zeigten, dass *U. maydis* auf Trp-Agar-Platten Pigmente produziert, die nach Extraktion, Säulenchromatographie und Dünnschichtchromatographie eine ähnlich komplexe Zusammensetzung wie die von *M. furfur* erzeugten Pigmente aufwiesen (Abb. 11) Über LC-MS und NMR-Analysen konnte die Anwesenheit der Trp-Metabolite Pityriacitrin (PCit), Pityriaanhydrid (PyA), Malasseziazole A (MA), Malasseziaindole A (MI), Pityriarubin B (PitB) und Pityriarubin C (PitC) in Extrakten beider Organismen nachgewiesen werden (Abb. 9).

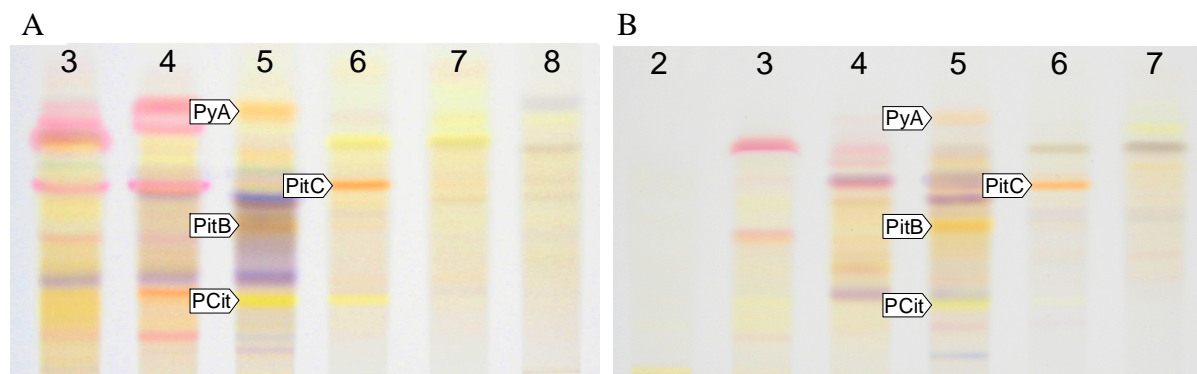


Abb. 11. Dünnschichtprofile von fraktionierten Pigmentextrakten, die über eine Sephadex LH20 Säule eluiert worden waren. Die Pigmentextrakte wurden aus mit *M. furfur* (A) und *U. maydis* (B) bewachsenem Trp-Agar gewonnen. Die Pfeile bezeichnen die Substanzen mit beschriebenen biologischen Effekten. Pityriarubin A (PyA), Pityriarubin C (PitC), Pityriarubin B (PitB), Pityriacitrin (PCit).

1.4 Identifizierung von *U. maydis*-Mutanten, die unfähig sind, in Anwesenheit von Tryptophan Pigment zu bilden

Um Gene zu identifizieren, die in der Pigment-Biosynthese involviert sind, wurde der *U. maydis* Wildtyp-Stamm 521 von Wenying Wu mittels UV-Strahlung mutagenisiert, wobei 10^5 Mutanten erzeugt wurden. 44 davon unterschieden sich auf Trp-Agar-Platten in der Farbe vom Wildtyp. Von allen generierten Mutanten zeigten nur fünf (UV31, WW01, WW02, WW03 und WW04) eine vollständige Pigment-Defizienz. Die kleine Anzahl an identifizierten Mutanten könnte einerseits auf die Beteiligung sehr weniger Gene in der Pigmentbiosynthese zurückzuführen sein, andererseits auf die Existenz multipler paralleler Biosynthese-Wege.

Um die betroffenen Gene zu identifizieren, wurde zunächst eine der Mutanten, UV31, mit einer genomischen Bank von *U. maydis* transformiert, die auf einem autonom replizierenden Plasmid basiert, welches Resistenz gegen Hygromycin vermittelt. Plasmide, die Pigmentproduktion fördern, wurden von Transformanten mit brauner Kolonie-Farbe re-

isoliert, in *E. coli* amplifiziert und die enthaltene *U. maydis*-DNA ansequenziert. Interessanterweise enthielten vier der re-isolierten Plasmide DNA aus dem gleichen Genombereich von *U. maydis*.

Um zu testen, ob die anderen UV-Mutanten mit Pigmentbildungsdefekt eine Mutation in der gleichen oder einer anderen Genomregion aufwiesen, wurde eines der isolierten Plasmide (p18n1) in vier (UV31, WW02, WW03 und WW04) der fünf Pigment-defizienten Mutanten eingebracht. Überraschenderweise führte das Einbringen des Plasmids in allen getesteten Mutanten zur Wiederherstellung des Pigment-Produktionsvermögens. Dies deutete darauf hin, dass in allen vier identifizierten UV-generierten Stämmen die gleiche Genregion betroffen war.

1.5 Ziele der Arbeit

Mit Hilfe von *U. maydis* als Modellorganismus sollten die am Trp-abhängigen Pigmentsyntheseweg beteiligten Gene ermittelt und die Funktion der kodierten Proteine charakterisiert werden.

Die biologischen Effekte der Trp-abhängigen Pigmente sollten getestet und auf einen möglichen Zusammenhang mit der Symptomatik der Pityriasis versicolor überprüft werden.

2 Ergebnisse Teil 1

2.1 Identifizierung von Punktmutationen in den *U. maydis*-Mutanten, die unfähig sind, in Anwesenheit von Tryptophan Pigment zu bilden

Die durch UV-Mutagenese von Wenying Wu generierten fünf identifizierten nicht-kolorierten Mutanten (UV31, WW01, WW02, WW03 und WW04) wuchsen gut auf Komplettn Medien, aber zeigten einen schweren Wachstumsdefekt auf Trp-Agar (am Beispiel von UV31, WW01 und WW02 gezeigt; Abb. 13A). Diese Mutanten konnten von Wenying Wu mit verschiedenen Plasmiden aus einer genomischen Bank von *U. maydis* komplementiert werden. Die Inserts der komplementierenden Plasmide enthielten verschiedene Fragmente aus dem *U. maydis* Genom, die in einer Region überlappten (Abb. 12, oberer Teil). Diese Region enthielt einen einzelnen offenen Leserahmen (ORF; um02922), hier *sir1* genannt, der möglicherweise für eine Nitrit/Sulfit-Reduktase kodiert (Abb. 12, mittlerer Teil).

Um zu überprüfen, ob allein die Abwesenheit einer funktionalen Sulfitreduktase für den Verlust der Pigmentproduktion auf Trp-Agarplatten verantwortlich war, wurde versucht, den vollständigen offenen Leserahmen von *sir1* im *U. maydis* Wildtyp Stamm 521 mittels doppelt homologer Rekombination durch eine Hygromycinresistenzkassette zu ersetzen. Eine Analyse von 67 hygromycinresistenten Transformanten ergab, dass diese alle die Hygromycinresistenzkassette als ektopische Integration enthielten. Dies könnte bedeuten, dass die Sulfit/Nitrit-Reduktase unter den getesteten Bedingungen ein essentielles Gen ist. Um zu zeigen, dass die Sulfit/Nitrit-Reduktase in *U. maydis* ein essentielles Gen darstellt, könnte eine Kopie des Gens im diploiden Stamm FBD11 deletiert werden. Die durch Pflanzeninfektion gewonnenen Sporen müssten nach Auskeimen auf die haploiden Nachkommen untersucht werden. Wenn keine hygromycinresistenten haploiden Nachkommen identifiziert werden können, dann würde dies zeigen, dass eine Deletion dieses Gens Lethalität zur Folge hätte. Darüber hinaus wäre es aber auch möglich, *sir1* hinter einen induzierbaren Promoter zu klonieren. Wenn ein solcher Stamm dann nur unter induzierenden Bedingungen lebensfähig ist, dann würde dies auch ein Beleg dafür sein, dass *sir1* ein essentielles Gen ist.

Um zu identifizieren, an welchen Stellen das *sir1*-Gen und dessen Promotorregion in den generierten UV-Mutanten defekt ist, wurden die jeweiligen DNA-Abschnitte aus vier der fünf Mutanten und aus dem Wildtyp amplifiziert, sequenziert und die erhaltenen Sequenzen

miteinander verglichen. Die Sequenzanalyse ergab, dass in den Mutanten UV31, WW01 und WW03 eine identische Ein-Basenpaardeletion vorhanden war (nt 3113 des *sirI*-ORFs), die zu einer Leserahmenverschiebung und zur Ausbildung eines Proteins führen sollte, dem die C-terminale Domäne fehlt. Bei der Mutante WW02 wurde eine andere Ein-Basenpaardeletion detektiert (nt 3947 des *sirI* ORFs), die ebenfalls in einer Leserahmenverschiebung und einem daraus folgenden verkürzten Protein resultieren würde, dem die C-terminale Domäne fehlt (Abb. 12, mittlerer Teil).

komplementierende Plasmide

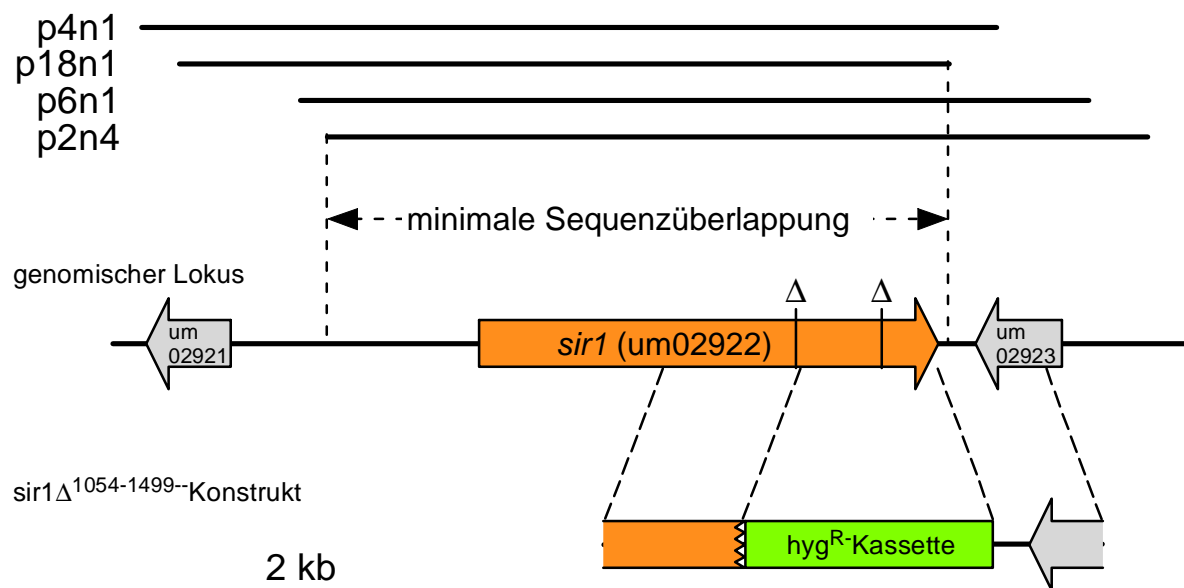


Abb. 12: Identifizierung von Mutationen in *sirI* als Grund für die Pigmentdefizienz isolierter Mutanten durch Komplementation (oben), Sequenzierung UV-generierter Mutanten (Mitte) und Partialdeletion der Sir1-C-terminalen Region (unten). Mutante UV31 wurde mit einer genomischen Bank von *U. maydis* komplementiert. Die schwarzen horizontalen Linien kennzeichnen Insert-Sequenzen der komplementierenden Plasmide p4n1, p18n1, p6n1 und p2n4 verglichen mit dem relevanten Abschnitt aus dem Genom von. Die minimale Insert-Sequenz-Überlappung beinhaltet nur das *sirI*-Gen. Die Δ -Symbole zeigen die Position der 1 bp-Deletionen im *sirI*-ORF (blauer Pfeil) von UV31, WW01, WW02, und WW03 an. Diese Mutationen führen zu C-terminal verkürzten Sir1-Proteinen. Darunter ist das Konstrukt dargestellt, welches für den Austausch der C-terminalen Domäne mit einer Hygromycinkassette (hyg, grünes Rechteck) konstruiert wurde (Abbildung modifiziert nach J. Schirawski).

Um zu verifizieren, dass die Abwesenheit der C-terminalen Domäne für den Verlust der Pigmentbildung verantwortlich ist, wurden die Nukleotide (nt) 1054-1499 des *sirI*-Orfs über doppelt homologe Rekombination durch eine Hyg-Resistenzkassette ersetzt (Abb. 12, unterer Teil). Den erhaltenen Deletionsmutanten 521sir1 $\Delta^{1054-1499}$ #11 und 521sir1 $\Delta^{1054-1499}$ #30 fehlte ausschließlich die C-terminale Domäne (Aminosäuren 1054 bis 1499) von Sir1. Beide Mutanten zeigten einen Pigmentverlust und auch einen Wachstumsdefekt auf Trp-Platten, vergleichbar mit dem Phänotyp der UV-generierten Mutanten (Abb. 13A). Dies spricht dafür, dass der beobachtete Phänotyp tatsächlich durch eine nichtfunktionale Sir1-C-terminale Domäne verursacht war.

Weil *sir1* potentiell für eine Sulfitreduktase kodiert, testete ich, ob die Phänotypen durch die exogene Zugabe von reduziertem Schwefel komplementiert werden können. Sowohl Pigmentproduktion als auch Wachstum auf Trp konnten durch den Zusatz von Met (Abb. 13B), Cystein oder Natriumsulfid zu Agarplatten, aber nicht durch Addition von Natriumsulfat oder Natriumsulfit (nicht gezeigt) komplementiert werden. Dies zeigt, dass *sir1* tatsächlich für eine Sulfitreduktase kodieren könnte.

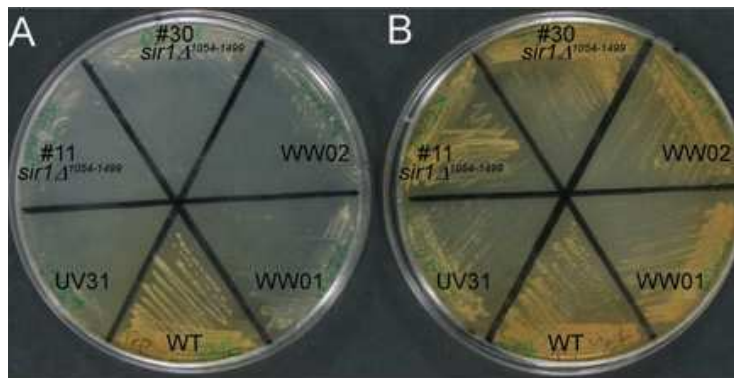


Abb. 13: Wachstums- und Pigmentierungsdefekt ausgewählter Mutanten auf Trp-Agar (A), jedoch nicht auf Trp-Agar plus Met (B). UV-generierte Mutanten (UV31, WW01 und WW02) sowie Mutanten, die eine C-terminale Deletion des *sir1*-ORFs (*sir1*Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹, Stämme #30 und #11) trugen, wurden auf Trp-Agar bzw. Trp-Agar plus Met (1.5 mM) ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

Um herauszufinden, ob das Pigmentprofil der *sir1*Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹-Mutanten verändert war, oder ob die Pigmentproduktion komplett beeinträchtigt war, wurden der Wildtyp-Stamm 521 und die Mutante 521*sir1*Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹#30 auf Trp-Platten in Abwesenheit und in Anwesenheit von Met angezogen und die entstehenden Pigmente extrahiert. DC von Gesamtextrakten zeigten, dass die Mutante 521*sir1*Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹#30 erheblich in ihrer Fähigkeit zur Pigmentproduktion beeinträchtigt war und dass die Anwesenheit von Met die Pigmentbildung wiederherstellte (Abb. 14).



Abb. 14. Vergleich der nichtfraktionierten Pigmentprofile per DC der 521 (WT)- und 521*sir1*Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹#30-Stämme, die auf Trp-Agar ohne (-) und mit (+) Met (1.5 mM) angezogen worden waren.

denen entweder das *tam1*-Gen, das *tam2*-Gen (C. Basse) oder beide Gene durch Antibiotikaresistenzkassetten ersetzt wurden.

Die erhaltenen Stämme 521 Δ *tam1*, 521 Δ *tam2* und 521 Δ *tam1* Δ *tam2* wurden auf ihr Vermögen getestet, Pigmente auf Trp-Agar zu produzieren. Die Pigmentproduktion in den Mutanten 521 Δ *tam1* und 521 Δ *tam1* Δ *tam2* war dramatisch reduziert, nicht aber in 521 Δ *tam2* (Abb. 16A).

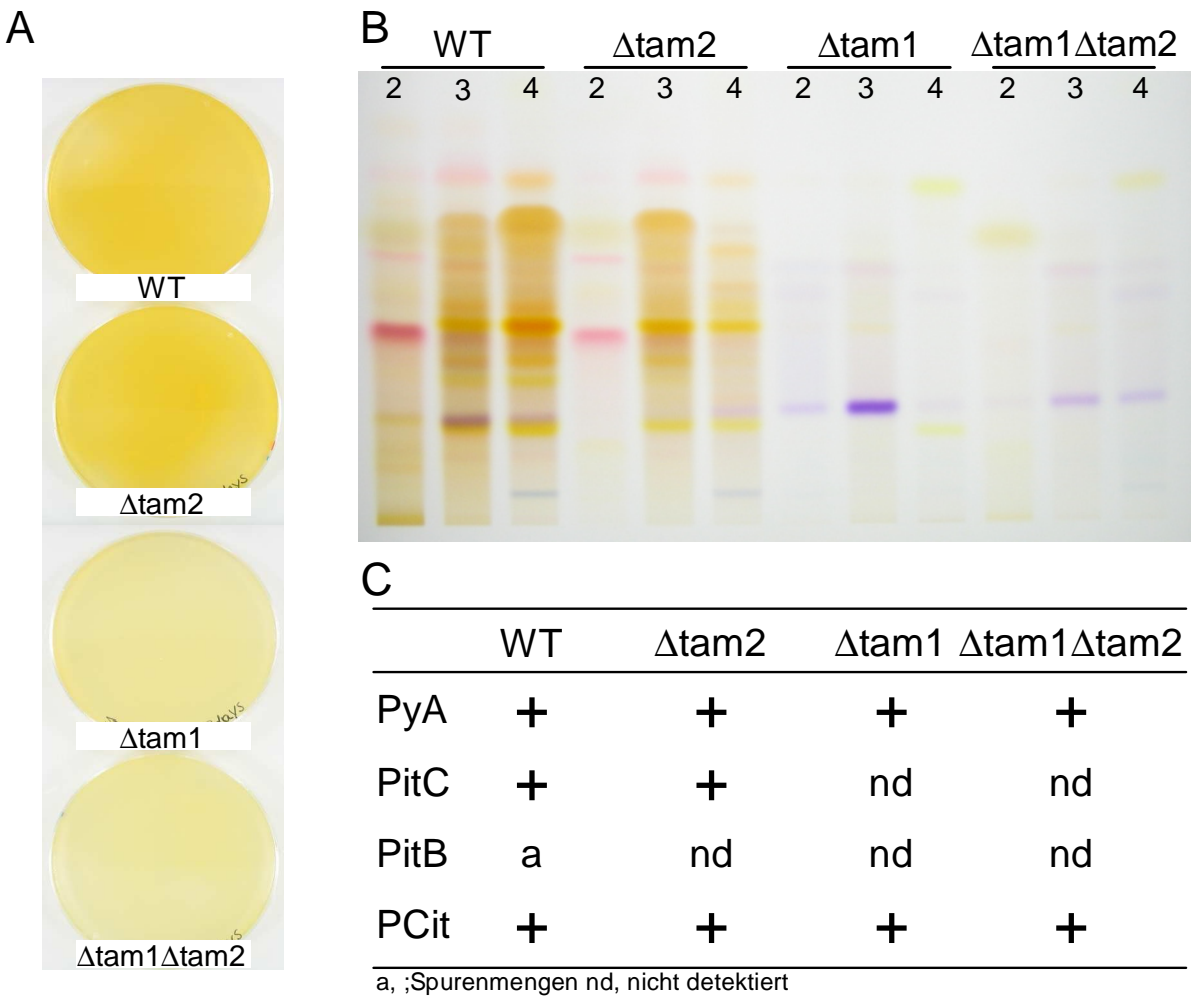


Abb. 16. Die Aminotransferase *Tam1*, aber nicht *Tam2*, ist an der Pigmentproduktion aus Trp beteiligt. **A.** Die Stämme 521 Δ *tam1* (Δ *tam1*) und 521 Δ *tam1* Δ *tam2* (Δ *tam1* Δ *tam2*) zeigen geringere Pigmentproduktion als der Wildtyp-Stamm 521 (WT) oder der 521 Δ *tam2*-Stamm (Δ *tam2*) nach Wachstum auf Trp-Agar bei 28°C. **B.** Vergleich der fraktionierten Pigmentprofile des Wildtyps und der Mutanten über DC. **C.** Detektion von ausgewählten Substanzen in den in B dargestellten Fraktionen über LC-ESI-MS (PitC, PitB) oder MS/MS (PyA, PCit) (Ursula Hettwer, Göttingen). „Spurenmengen“ und „nicht detektiert“ repräsentieren ein Verhältnis des Signals zum Rauschen von unter 30 bzw. von unter 10.

Die DC von fraktionierten Pigmentextrakten zeigte, dass 521 Δ *tam2* in der Lage war, dasselbe Pigmentprofil wie der Wildtypstamm 521 zu generieren. Im Gegensatz dazu zeigte 521 Δ *tam1* Δ *tam2* ein sowohl qualitativ als auch quantitativ deutlich verringertes Pigmentprofil (Abb. 16B). Zusätzlich ähnelten sich die Pigmentprofile von 521 Δ *tam1* und

521 Δ tam1 Δ tam2. Dies deutete daraufhin, dass Tam1 eine wichtige Rolle in der Produktion von Trp-abhängigen Pigmenten in *U. maydis* spielt, während Tam2 maximal einen zu vernachlässigenden Beitrag zur Pigmentproduktion leistet.

In den Extrakten der Δ tam1-Deletionsmutante und der Δ tam1 Δ tam2-Doppeldeletionsmutante konnte eine geringfügige Pigmentmenge beobachtet werden. Um die Identität der verbleibenden Substanzen zu untersuchen, wurden die fraktionierten Extrakte per LC-ESI-MS und MS/MS auf die Anwesenheit von PyA, PitC, PitB und PCit überprüft. Diese Analyse zeigte, dass PyA und PCit in den Extrakten von allen vier Stämmen enthalten waren (Abb. 16C). Während PitB in geringfügigen Mengen ausschließlich im Wildtyp-Extrakt detektiert werden konnte, nicht aber in den Extrakten der Mutanten, so war PitC den Extrakten des Wildtyps und der 521 Δ tam2-Mutante vorhanden, aber konnte nicht in Extrakten von tam1 Δ -Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 16C).

Die Anwesenheit von PyA und PitC in Extrakten aus 521 Δ tam1 und 521 Δ tam1 Δ tam2 könnte potentiell durch die Aktivität eines zusätzlichen Enzyms mit einer schwachen Aktivität für die Umsetzung von Trp-zu-IP erklärt werden. Ein möglicher Kandidat ist die Aspartat-Aminotransferase (die möglicherweise von um00595 kodiert wird). Für Aspartat-Aminotransferasen anderer Organismen wurde gezeigt, dass sie als Nebenreaktion Trp zu IP umsetzen können (Paris und Magasanik, 1981; Berger et al., 2001; Bittinger et al., 2003).

2.3 Tam1 koppelt die Trp-Deaminierung an die Aminierung von Phenylpyruvat und 2-Oxo-4-Methylthiobutyrat

Aro8 und Aro9 aus *S. cerevisiae* katalysieren die Umwandlung von Trp zu IP (Kradolfer et al., 1982). Um herauszufinden, ob Tam1 ebenfalls die Funktion einer IP-generierenden Trp-Transaminase übernimmt, wurde die IP-Produktion vom Wildtyp und der tam1 Δ -Mutante nach der Trp-Fütterung gemessen. IP wurde aus den Überständen von Kulturen extrahiert, die in Anwesenheit von 5 mM Trp für 14 h angezogen worden waren. Der Gehalt an Indol-Brenztraubensäure (IPA) wurde mittels HPLC gemessen. tam1 Δ -Mutanten stellten nur sehr wenig IPA her (~15 μ M, 4 % der Menge des Wildtyps), während tam2 Δ -Mutanten IP in der Größenordnung des Wildtyps produzierten (~400 μ M, Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass Tam1 eine Rolle als Trp-Aminotransferase spielt, die Trp zu IP umwandelt.

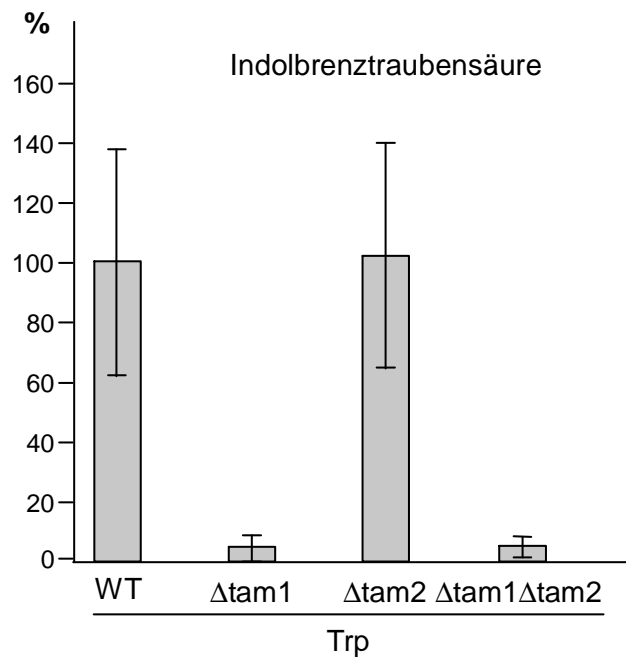


Abb. 17. Tam1 setzt Trp zu IPA um. Die Messung des IPA-Gehalts in Kulturüberständen von 521 (WT), 521 $\Delta tam1$ ($\Delta tam1$), 521 $\Delta tam2$ ($\Delta tam2$) und 521 $\Delta tam1\Delta tam2$ ($\Delta tam1\Delta tam2$) wurde nach 14 h Kultivierung in Glucose- (1%) und Trp- (5 mM) haltigem CM vorgenommen. IPA-Konzentrationen sind in Prozent vom Wildtyp-Durchschnitt dargestellt. Die Messungen wurden an jeweils drei unabhängigen Proben durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Für Aro8 und Aro9 aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass sie die Aminogruppe von Trp auf 2-Oxoglutarat (2-OG) bzw. auf Phenylpyruvat (PPy) als Aminogruppenakzeptor übertragen können (Kradolfer et al., 1982; Iraqui et al., 1998; Urrestarazu et al., 1998). Um herauszufinden, ob Tam1 2-OG oder PPy als Aminogruppenakzeptor benutzt, habe ich den Effekt von 2-OG bzw. PPy auf die Produktion von IPA aus Trp durch Zugabe dieser beiden Aminogruppenakzeptoren zum Wachstumsmedium untersucht.

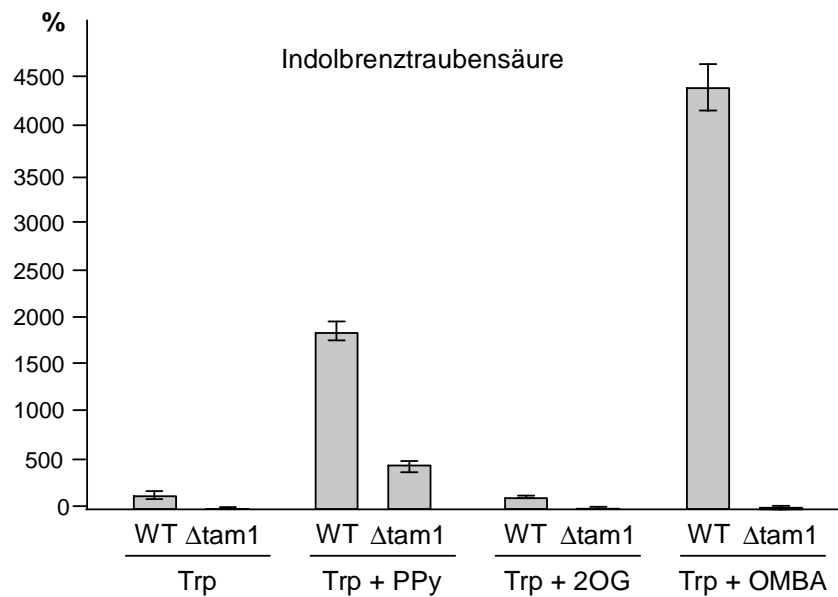


Abb. 18. Tam1 bevorzugt PPy vor 2-OG als Aminogruppenakzeptor. Zugabe von PPy oder OMBA zum Trp-Medium erhöht die Umsetzung von Trp zu IPA im Wildtyp (521, WT), aber nicht in 521Δtam1 (Δtam1). Die Stämme wurden in Glukose- (1%) und Trp- (5 mM) haltigem CM in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von PPy (1 mM), 2-OG (1 mM) oder OMBA (1 mM) angezogen. Der IPA-Gehalt ist als Prozent des Wildtyp-Mittelwerts bei Wachstum in CM mit Glukose (1%) und Trp (5 mM) dargestellt. Es wurden voneinander unabhängige Dreifach-Bestimmungen vorgenommen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Die Zugabe von PPy (1 mM), nicht aber von 2-OG (1 mM) zu WT-Zellen, die in der Anwesenheit von Trp (5 mM) wuchsen, führte zu einem 18fachen Anstieg in der IPA-Produktion, während die Zugabe von PPy zu Δtam1-Zellen nur zu einer vierfachen Erhöhung führte (Abb. 18). Dies zeigt, dass Tam1 mit PPy als Aminogruppenakzeptor aktiv ist und somit die Deaminierung von Trp an die Aminierung von PPy koppelt, vergleichbar mit der Funktion von Aro9 aus *S. cerevisiae*.

Die vierfache Erhöhung der IPA-Konzentration nach Zugabe von PPy zum Δtam1-Stamm deutete darauf hin, dass es noch mindestens ein weiteres Enzym mit einer schwachen Aktivität für PPy-abhängige Trp-zu-IP-Konversion geben könnte. Eine solche Aktivität könnte entweder von Tam2 stammen, die vielleicht nur bei einer erhöhten Konzentration an PPy aktiv wäre, oder von der potentiellen Aspartat-Aminotransferase (um00595), da Aspartat-Aminotransferasen bekanntlich eine breite Substratspezifität aufweisen (Jensen und Gu, 1996).

Durch Arbeiten an *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Aro9 auch die Aminierung von 2-Oxo-4-Methylthiobutyrat (OMBA) zu Met katalysieren kann (Urrestarazu *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob OMBA auch als Aminogruppenakzeptor für Tam1 fungieren kann, wurden dem Wildtyp und Δtam1-Stamm zusätzlich zu Trp (5 mM), OMBA (1 mM) angeboten. In Anwesenheit von OMBA produzierten Wildtyp-Zellen eine 44fach höhere

Menge an IPA (Abb. 18). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von OMBA zum $\Delta tam1$ -Stamm zu keiner Erhöhung der IPA-Produktion (Abb. 18). Um zu überprüfen, ob die dramatische Erhöhung der IPA-Konzentration bei Zugabe von OMBA auf die Aminierung von OMBA zu Met zurückzuführen ist, wurde die Met-Produktion des Wildtyps und des $\Delta tam1$ -Stammes nach Wachstum in Anwesenheit von OMBA verglichen (U. Hettwer, Göttingen). Die Wildtypzellen akkumulierten eine doppelt so hohe Met-Konzentration in Kulturüberständen wie die $\Delta tam1$ -Mutanten (Abb. 19). Dies deutet darauf hin, dass Tam1 aus *U. maydis* durch Aminierung von OMBA zur Met-Produktion beiträgt und somit Met-Produktion und Trp-Deaminierung gekoppelt sind.

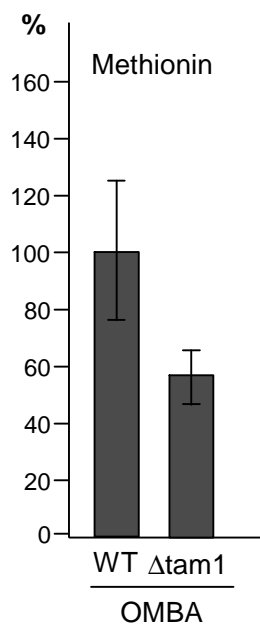


Abb. 19. Messung des Met-Gehaltes aus zwei aus den in Abb. 17 dargestellten Proben nach Wachstum in CM, welches Glukose (1 %), Trp (5 mM) und OMBA (1 mM) enthält. Der Met-Gehalt ist in Prozent vom Wildtyp-Mittelwert dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei Replikaten an.

2.4 Biochemische Charakterisierung von Tam1

Um zu überprüfen, ob Tam1 tatsächlich in der Lage ist, die aus den Fütterungsexperimenten abgeleiteten Reaktionen auszuführen, wurde Tam1 aus *U. maydis* heterolog als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und durch Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 20).

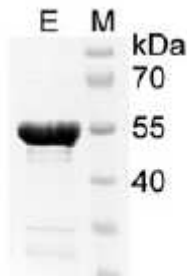
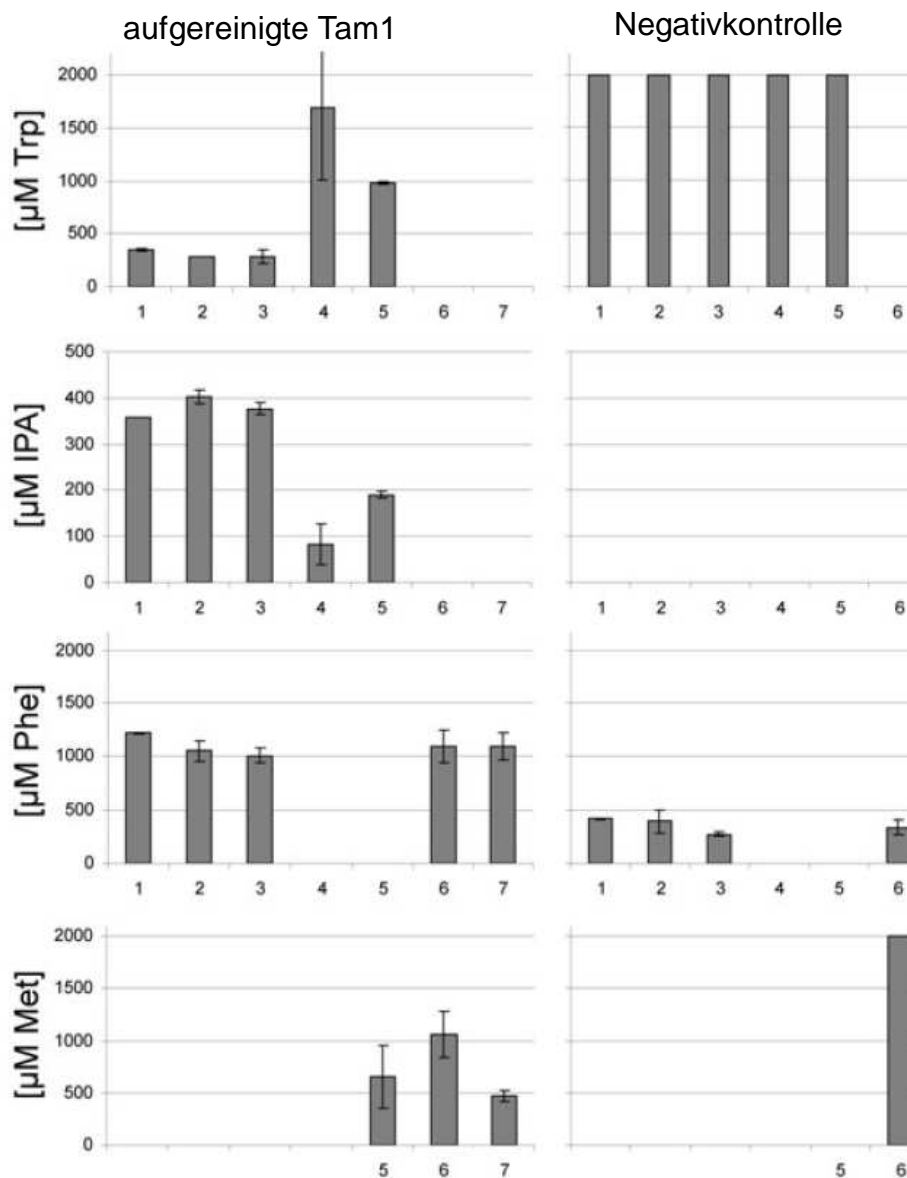


Abb. 20. Aufreinigung von Tam1. Coomassie-gefärbtes Acrylamidgel, welches die Elutionsfraktion (E) von Tam1 zeigt, die für die Enzym-Assays (Abb. 21) eingesetzt wurde. Als Größenstandard (M) wurde der „prestained Proteinruler“ (Fermentas) eingesetzt.

Enzympräparationen wurden für eine Stunde mit verschiedenen Aminogruppenakzeptoren und Aminogruppendonoren inkubiert, und die Konzentrationen von Trp, IPA, Phe und Met mittels HPLC bestimmt. Nach Inkubation der aufgereinigten Tam1 mit Trp und PPy (Abb. 21, Versuchsbedingung 1) wurden Konzentrationen von ca. 400 μM an IPA und ca. 1000 μM an Phe erreicht, während der größte Teil an Trp aufgebraucht war. Da IPA sehr instabil ist und spontan in IAA und andere Stoffe zerfällt (s. Kapitel 1), ist davon auszugehen, dass die tatsächlichen IPA-Konzentrationen größer waren als die hier ermittelten Werte. Die zusätzliche Anwesenheit von 2-OG konnte den Gehalt an IPA oder Phe nicht signifikant steigern (Abb. 21, Versuchsbedingungen 2 und 3). Wenn Trp und 2-OG gemeinsam inkubiert wurden, wurde nur eine kleine Menge an IPA produziert (Abb. 21, Versuchsbedingung 4). Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, dass unter den verwendeten Bedingungen PPy gegenüber 2-OG einen bevorzugten Aminoakzeptor der Tam1 aus *U. maydis* darstellt.



Versuchsbedingungen

- | | |
|-------------------|------------|
| 1 Trp+PPy | 5 Trp+OMBA |
| 2 Trp+PPy+2-OG | 6 Met+PPy |
| 3 Trp+PPy+2(2-OG) | 7 Phe+OMBA |
| 4 Trp+2-OG | |

Abb. 21. Enzym-Aktivitäts-Tests. Verschiedene Substrate (jeweils 2 mM) wurden in verschiedenen Kombinationen (wie unterhalb der Säulendiagramme gekennzeichnet) mit (links) oder ohne (rechts) aufgereinigter Tam1 für 1 h bei 48°C inkubiert. Die Negativkontrolllexperimente (rechts) wurden mit vereinigten Elutionsfraktionen des *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS -Stamms, der den pET15b-Leervektor trug, durchgeführt. Der Gehalt an Trp, IPA und Phe in den Reaktionsmischungen wurde über HPLC bestimmt. Die Met-Konzentrationen für die Versuchsbedingungen 5, 6 und 7 wurden über HPLC-MS/MS von U. Hettwer (Göttingen) bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Fütterungsexperimente deuteten darauf hin, dass Tam1 die Umwandlung von OMBA zu Met katalysieren kann. Für Aro9 aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Umwandlung von Met zu OMBA an die Umsetzung von Phe

zu PPy gekoppelt ist (Urrestarazu et al., 1998). Deshalb wurde getestet, ob die Tam1-Enzympräparation ebenfalls die Reaktion von OMBA zu Met unter der Bildung von PPy aus Phe katalysieren kann (Abb. 21, Versuchsbedingung 7). Tatsächlich führte die Reaktion von Tam1 mit OMBA und Phe zur Generierung von Met (~500 µM) und einer Halbierung der Phe-Konzentration (von 2 mM auf ~1 mM). Im Gegensatz dazu wurde die Met-Konzentration um die Hälfte (von 2 mM auf ~1 mM) vermindert und es entstand eine Phe-Konzentration von 1 mM, wenn das Enzym mit Met und PPy inkubiert wurde (Abb. 21, Versuchsbedingung 6). Dies zeigte, dass die gereinigte Tam1 in der Lage ist, den Aminogruppentransfer von Phe zu OMBA zu katalysieren. Daher bestätigten auch diese Experimente, dass die Trp-Deaminierung indirekt an die OMBA-Aminierung durch Tam1-katalysierte Umsetzung von PPy zu Phe gekoppelt sein könnte (s. Diskussion und Abb. 28). Um zu testen, ob Tam1 evtl. auch direkt OMBA als Aminoakzeptor für die Deaminierung von Trp verwenden könnte, habe ich die Enzympräparation mit Trp und OMBA (Abb. 21, Versuchsbedingung 5) inkubiert. Diese Reaktion führte zur Generierung von IPA (~200 µM) und Met (~600 µM), was zeigt, dass OMBA auch als direkter Aminogruppenakzeptor für die Deaminierung von Trp zur Verfügung steht. Jedoch scheint PPy ein besseres Substrat für Tam1 als OMBA zu sein, da in Anwesenheit von PPy im Vergleich zu OMBA die 2,5 fache Menge an IPA generiert wird.

2.5 Die Deletion von Tam1 hat keinen Effekt auf die Virulenz von *U. maydis*

Da den von *M. furfur* produzierten Pigmenten eine Funktion während der Pityriasis versicolor zugeschrieben werden, wurde getestet, ob die Tam1-vermittelte Pigmentbildung für die Virulenz von *U. maydis* auf dessen Wirtspflanze Mais verantwortlich ist. Deshalb wurde ein rekombinanter *U. maydis*-SG200-Stamm erzeugt, bei dem der *tam1*-ORF durch eine Cbx-Resistenz-Kassette ersetzt wurde. Der *U. maydis*-Stamm SG200 ist ein solopathogener Stamm und ein Derivat des Wildtyp-Stamms FB1. Er enthält die kompatible *bE1/bW2*-Kombination und das *mfa2*-Gen. Diese Modifikationen führen dazu, dass SG200 sowohl über einen aktiven *a*- als auch über einen aktiven *b*-Lokus verfügt und ein infektiöses Filament unabhängig von einem Kreuzungspartner bilden kann (Bölker et al., 1995).

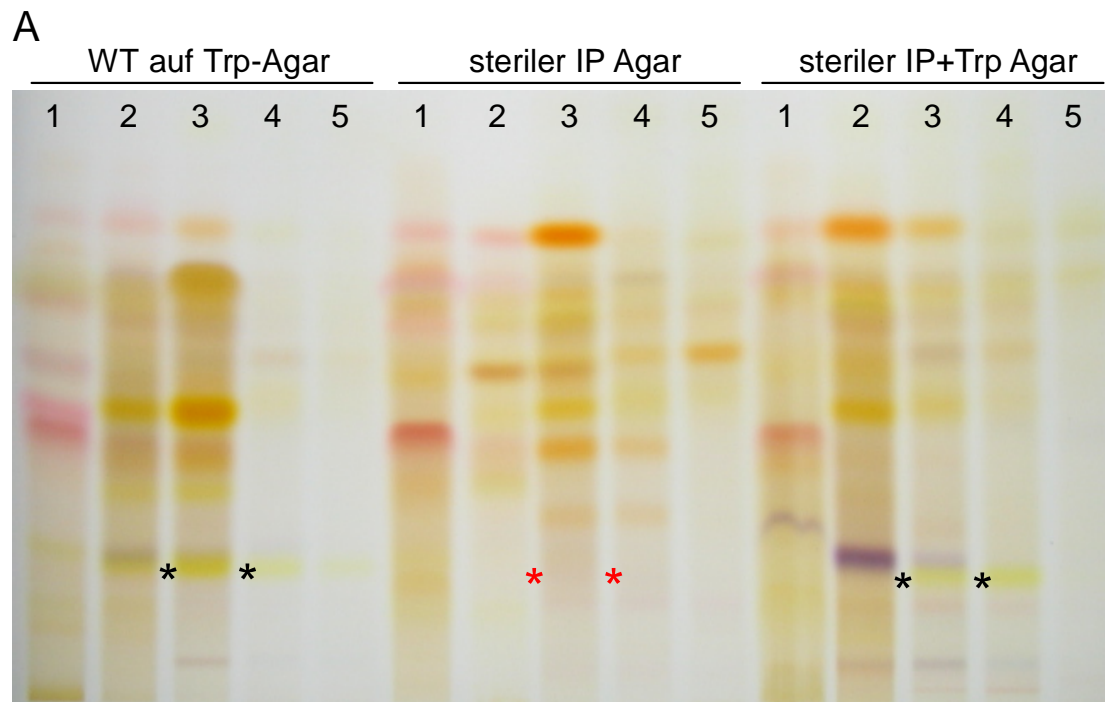
Mit den beiden unabhängigen Transformanten SG200Δ*tam1*#2 und SG200Δ*tam1*#7 sowie mit dem SG200-Kontrollstamm wurden 7-Tage-alte Pflanzen der Maisvarietät Early Golden Bantam infiziert. Beim Kontrollstamm SG200 zeigten 25 der 37 inokulierten Pflanzen (70%) Tumor-Bildung, typische Zeichen einer *U. maydis*-Infektion. Bei den Mutanten-Stämmen

SG200 Δ tam1#2 und SG200 Δ tam1#7, entwickelten 25 von 36 Pflanzen (69%) und 26 von 38 Pflanzen (68%) Tumore, die in ihrer Größe vergleichbar zu denen des Kontrollstammes waren. Dies zeigt, dass eine Tam1-Deletion unter den getesteten Bedingungen zu keiner Verminderung der Pathogenität von *U. maydis* führt. Dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass IP oder die Pigmente einen Effekt auf die Pathogenität haben, da sie in geringer Menge auch in der Tam1-Deletionsmutante gebildet werden (s. Abb. 16B und C).

2.6 Pigmente werden spontan aus IP und Trp gebildet

Um weitere Gene zu identifizieren, die in der Pigmentbiosynthese involviert sind und Tam1-generierte Produkte umsetzen, untersuchten wir, ob der Pigmentierungsdefekt der Δ tam1-Mutante durch die Zugabe von IP zum Wachstumsmedium komplementiert werden kann. Bei diesem Experiment konnten wir folgende Beobachtung machen: Nachdem das Medium mit gereinigtem IP supplementiert worden war, wechselte die Farbe des Mediums innerhalb weniger Minuten von hellgelb nach tiefrot. Dies ließ vermuten, dass aus IP in einer wässrigen Umgebung spontan farbige Substanzen entstehen. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor gemacht (Paris und Magasanik, 1981; Bittinger et al., 2003), wobei jedoch die farbigen Substanzen bisher nicht analysiert worden waren.

Auf Grund der Beobachtung, dass IP spontan zur Pigmentbildung fähig ist, wurden Pigment-Extrakte von Trp-haltigen Agarplatten hergestellt, die mit *U. maydis*-Wildtyp-Zellen inokuliert worden waren, sowie von sterilen Agarplatten, die entweder IP oder Trp und IP enthielten. Die Extrakte wurden fraktioniert und über DC analysiert (Abb. 22A).



B

	WT auf Trp-Agar	steriler IP-Agar	steriler IP+Trp-Agar
PyA	+	+	+
PitC	+	+	+
PitB	+	nd	+
PCit	+	a	+

a, Spuren Mengen; nd, nicht detektiert

Abb. 22. Pigmente können spontan in Anwesenheit von IP gebildet werden. A. DC-Analyse von fraktionierten Pigmentextrakten aus Trp-Agar, der mit *U. maydis* WT-Stamm 521 inokuliert war, aus sterilem IP-Agar und aus sterilem IP+Trp-Agar. Die Platten wurden drei Tage bei 28°C im Dunkeln inkubiert, bevor Pigment extrahiert wurde. Die Position der gelben Substanz, die an derselben Stelle wie PCit läuft (R_f -Wert=0,15), ist deutlich sichtbar in Extrakten aus 521 auf Trp-Agar und in Extrakten aus sterilem IP+Trp-Agar (schwarze Sternchen), aber ist im Extrakt aus IP-Agar abwesend (rote Sternchen). B. Test auf Anwesenheit der Substanzen PitC, PyA, PitB und PCit in den in A gezeigten Fraktionen mittels LC-ESI-MS (PitC, PitB) und MS/MS (PyA, PCit). Spuren Mengen und „nicht detektiert“ repräsentieren ein Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen von unter 30 bzw. von unter 10.

Zu unserer Überraschung zeigten die Pigmentprofile der *U. maydis*-Kultur keine qualitativen Unterschiede zum Kontrollprofil aus sterilem Trp+IP-Agar (Abb. 22). Beim Profil aus dem sterilen IP-Agar konnte beobachtet werden, dass einige wenige Substanzen im Gegensatz zu den anderen beiden Profilen abwesend waren. Eine dieser Substanzen ist hellgelb und hat einen R_f -Wert von 0,15, der dem von Pityriacitrin entspricht (Abb. 22A; Mayser et al., 2002). Um zu untersuchen, ob die Mischung an spontan generierten Pigmenten die zuvor identifizierten Substanzen mit biologischer Aktivität enthielt, wurden alle Fraktionen

individuell von U. Hettwer (Göttingen) per LC-ESI-MS and MS/MS analysiert. Diese Analyse zeigte, dass PyA, PitC, PitB and PCit nicht nur in den Extrakten von *U. maydis* inokulierten Trp-Agar-Platten auftrat, sondern auch in Extrakten aus sterilem IP+Trp-Agar (Abb. 22B). Aus sterilem IP-Agar wurden PyA und PitC, aber nicht PitB und nur Spuren von PCit detektiert (Abb. 22B).

Um auszuschließen, dass die Generierung der Indolpigmente weitere Substanzen involvierte, die in den Agarplatten vorhanden waren, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Dabei wurde das Gesamtpigment aus sterilen wässrigen Lösungen von IP und IP+Trp 24 h nach Auflösen dieser Substanzen in Wasser analysiert. Die Extrakte wurden per LC-HR-ESI-MS und LC-HR-ESI-MS/MS von Peter Spiteller (München) analysiert.

Die Anwesenheit von PyA und PCit, sowie Restmengen an PitC wurde auf Grund der LC-Retentionszeiten und der MS-Daten bestätigt, die in guter Übereinstimmung mit Referenz-Proben waren (s. Material und Methoden). Daher konnte geschlossen werden, dass die untersuchten Substanzen PyA, PCit and PitC spontan in einer wässrigen Umgebung entstehen können, die IP und Trp enthält. Abgeleitet von der deutlichen Ähnlichkeit der Pigmentprofile – einerseits generiert durch *U. maydis* aus Trp – andererseits generiert durch die spontane Reaktion von IP und Trp (Abb. 22B) ist es sehr wahrscheinlich, dass IP ein Vorläufer für die spontane Generierung der meisten, wenn nicht aller Substanzen ist, die in den Pigmentextrakten von *U. maydis* gefunden wurden. Damit übereinstimmend wurde beobachtet, dass sich die Reaktionsmixturen (Versuchsbedingungen 1-5, Abb. 21), die mit aufgereinigtem Tam1-Enzym inkubiert worden waren, in unterschiedlichem Ausmaß bräunlich verfärbten. Dieses unterschiedliche Ausmaß entsprach proportional den unterschiedlichen Mengen an gemessenem IPA. Daher besteht der biosynthetische Weg von Trp zu den Trp-abhängigen Pigmenten aus einem einzigen enzymatischen Schritt, der Deaminierung von Trp zu IP, katalysiert durch Tam1.

2.7 Effekte der Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf HaCaT-Zelllinien

Bittinger et al. (2003) konnten zeigen, dass IP in wässriger Umgebung Liganden des Arylhydrocarbonrezeptors (AhR) produziert. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass IP in wässriger Lösung zu den von Mayser und Mitarbeitern für *M. furfur* beschriebenen Indolpigmenten reagiert. Daher könnte es sein, dass die Indolpigmente als Liganden des AhR wirken.

Der AhR ist ein Rezeptor, der zunächst nur in Wirbeltieren nachgewiesen wurde. Der AhR bindet planare, aromatische Kohlenwasserstoffe (Übersichtsartikel von Swanson und Bradfield, 1993) und aktiviert transkriptionell viele Enzyme, die in Transformations- und Exkretionsprozesse von Fremdstoffen involviert sind. Der AhR spielt daher eine zentrale Rolle im Fremdstoffmetabolismus (Nebert et al., 2004; Uno et al., 2004; Xu et al., 2005). Große Bekanntheit erlangte er als Dioxinrezeptor (zusammengefasst von Birnbaum und Tuomisto, 2000; Schechter et al., 2006) und in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen (Hennig et al., 2002). Transgene Mäuse, die den AhR in Keratinozyten konstitutiv exprimieren, weisen schwere Entzündungsreaktionen und damit verbunden atopische Ekzeme auf (Tauchi et al., 2005). AhR-Agonisten wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin oder 12(R)-Hydroxy-5(Z),8(Z),10(E),14(Z)-eicosatetraen-Säure induzieren eine Entzündungsreaktion (Henley et al., 2004; Chiaro et al., 2008), AhR-Antagonisten wie *a*-Naphthoflavon (α NF) hingegen verhindern eine Entzündungsreaktion (Henley et al., 2004). Ein Symptom und zugleich Phänomen der Pityriasis versicolor ist die Insensibilität gegenüber UV-Strahlung in den weißen, demelanisierten Hautarealen. So ist die Krankheit einerseits nicht von Entzündungsanzeichen begleitet, und andererseits werden durch zusätzliche UV-Bestrahlung keine typischen Entzündungsanzeichen wie Sonnenbrand hervorgerufen (Thoma et al. 2005). Krutmann und Mitarbeiter (2007) konnten zeigen, dass auch die dem Sonnenbrand vorausgehende UV-B-Stressantwort über den AhR vermittelt wird. AhR-Aktivierung erfolgt dabei über das Trp-Photoprodukt FICZ. Eine Inhibition des AhR könnte somit für die fehlenden Entzündungsanzeichen verantwortlich sein.

Weiterhin hat der AhR Einfluss auf den Zellzyklus (Huang und Elferink, 2004; Übersichtsartikel von Ma et al., 2009). So gleichen sich die Transkriptionsprofile nach Aktivierung des AhR und nach kleineren DNA-Schäden zu großen Teilen (Hockley et al., 2007). Der aktivierte AhR kann wie auch der Zustand kleinerer DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest induzieren (Han et al., 2008), was aktivierte DNA-Reparaturmechanismen zur Folge hat (Lo et al., 2005). Über die Aktivierung des proapoptotischen Faktors Bax kann der AhR auch Apoptose einleiten (Detmar et al., 2006). Z. B. wird der AhR-Agonist Aminoflavon als Brustkrebsmittel getestet, da er Apoptose in Krebszelllinien induziert (McLean et al., 2008).

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen IP-generierten Substanzen und Symptomen der Pityriasis versicolor mittels AhR besteht, wurde in humanen HaCaT-Zelllinien getestet, ob AhR-sensitive Parameter wie Inflammationsantwort oder Zellzykluskontrolle durch in Wasser gelöstes IP moduliert werden können.

2.7.1 Einfluss von Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf die Entzündungsreaktion in HaCaT-Zellen

Sollten die aus Indolpyruvat generierten Substanzen in der Lage sein, eine AhR-vermittelte Entzündungsreaktion zu verhindern und somit als AhR-Antagonisten wirken, so könnte dies die fehlenden Entzündungsanzeichen in den Läsionen der Pityriasis versicolor erklären. Die IP-generierten Substanzen wurden zwar als Agonisten des AhR beschrieben (Bittinger et al., 2004), dies würde jedoch im Gegensatz zur ausbleibenden Entzündungsreaktion in der Pityriasis versicolor stehen. Es wurde daher getestet, ob die IP-generierten Substanzen Antagonisten des AhR darstellen und ob sie für das Ausbleiben von Entzündungsanzeichen nach UV-Bestrahlung verantwortlich sind. Ein typischer Entzündungsparameter ist die Hochregulierung und Sekretion des Cytokins Interleukin 6 (IL-6), dessen Konzentration über „enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (ELISA) quantitativ bestimmt werden kann (Henley et al., 2004).

HaCat-Zellen wurden in 48-Well-Platten zu 100.000 Zellen/Well ausplattiert und dann über Nacht im Brutschrank inkubiert, um Adhärenz zu gewährleisten. Die Zellen in den Wells wurden in Triplikaten mit Kontrollpuffer (PBS + 0,2% DMSO), Agonistenpuffer (PBS + 10 μ M FICZ + 0,2% DMSO) und Testpuffer (PBS + 100 μ M Indolpyruvat) behandelt. Indolpyruvat wurde immer frisch angesetzt. Um zu gewährleisten, dass sich eine hinreichend große Menge an Indolpyruvat-abhängigen Stoffen bilden konnte, wurde eine 10fach höhere Konzentration an Indolpyruvat als an FICZ eingesetzt.

Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellüberstände eingefroren und der Gehalt an IL-6 mittels ELISA bestimmt.

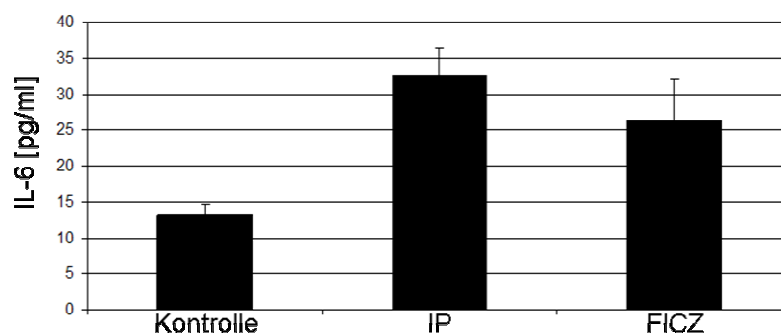


Abb. 23. Gehalt an IL-6 nach Inkubation für eine Stunde in verschiedenen Medien. Die Überstände von mit Kontrollmedium (Kontrolle), IP (100 μ M) und Formyl-Indol-Carbazol (FICZ, 10 μ M) behandelten Zellen wurden nach 1 h Inkubation eingefroren und der IL-6-Gehalt später mittels ELISA bestimmt. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und die Standardabweichungen dargestellt.

Nach einer Stunde Inkubation war die IL-6-Konzentration in den Überständen der mit FICZ (10 μ M) behandelten Zellen mit 28 pg/ml etwa doppelt so hoch wie in den Überständen der unbehandelten Kontrollzellen, für die ein Gehalt an 14 pg/ml gemessen wurde (Abb. 23).

Damit stieg die IL-6-Konzentration als Marker für eine Entzündungsreaktion in den FICZ-behandelten Zellen an. Dies zeigt, dass die Behandlung von HaCaT-Zellen mit dem hochpotenten AhR-Agonisten FICZ eine Entzündungsreaktion auslösen konnte. Nach Behandlung der HaCaT-Zellen mit einer Lösung von IP in Wasser stieg der IL-6-Gehalt in den Überständen auf 34 pg/ml (Abb. 23). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei IP oder den aus IP generierten Substanzen um AhR-Agonisten handelt, die eine Entzündungsreaktion fördern. Damit kann die Wechselwirkung der aus IP generierten Substanzen mit dem AhR nicht das Symptom der ausbleibenden Entzündungsreaktion in Läsionen der Pityriasis versicolor erklären.

Um zu überprüfen, ob den Substanzen eine Bedeutung in der Adaptation an eine leichte, in Läsionen der Pityriasis versicolor kaum sichtbare, Entzündungsreaktion zukommt, die dazu führt, dass bei zusätzlicher Bestrahlung mit UV-Licht keine Erhöhung der Entzündungsreaktion mehr stattfindet, wurde getestet, ob eine Behandlung mit IP eine Insensitivität gegenüber UV-Licht zur Folge hat. Dazu wurden HaCaT-Zellen mit Kontrollmedium [K, „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) + 0,2 % DMSO], Antagonistenmedium (α NF, DMEM + 10 μ M a-Naphthoflavon) und Testmedium (IP, DMEM + 100 μ M Indolpyruvat) behandelt und anschließend einmal mit UV-Licht (30 mJ/cm²) bestrahlt. Um den Effekt des UV-Lichts bewerten zu können, wurde der gleiche Test auch noch ohne UV-Bestrahlung durchgeführt (Abb. 24). Der Gehalt an IL-6 in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt.

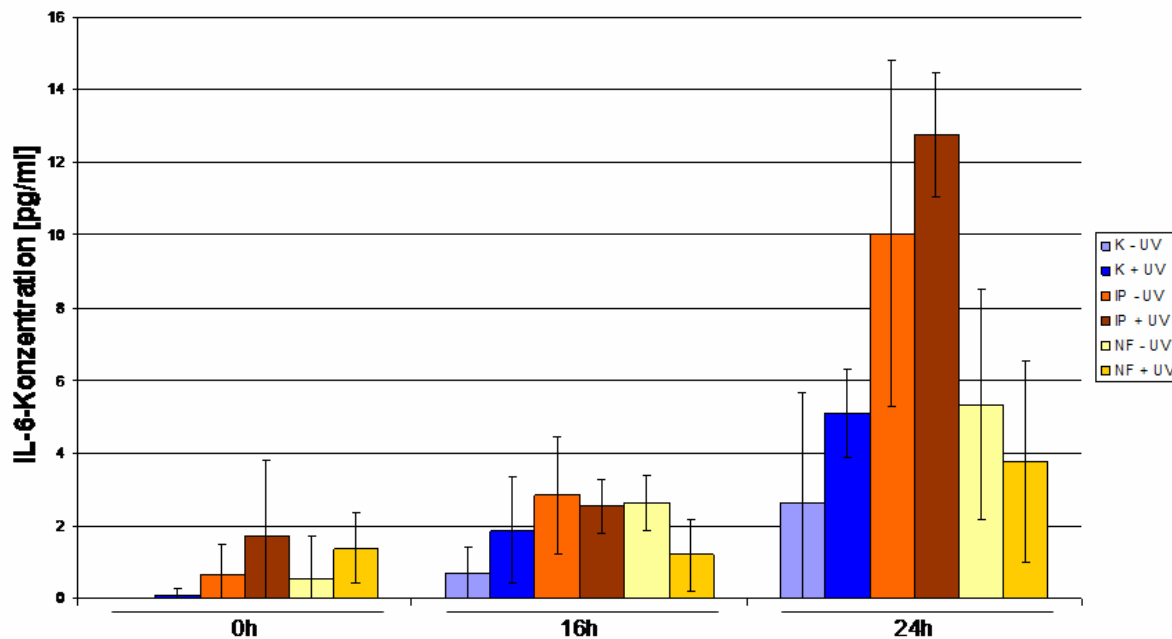


Abb. 24. IL-6-Produktion von HaCaT-Zellen nach Inkubation in verschiedenen Medien und mit oder ohne UV-Bestrahlung. Mit Kontrollmedium (K), IP und mit α -Naphthoflavin (α NF) behandelte Zellen wurden einmal mit UV-Licht (30 mJ/cm^2) bestrahlt und weiter bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Überstände eingefroren und der IL-6-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Die mit IP vorbehandelten Proben zeigten nach 24 h die höchsten IL-6-Werte, die mit α -NF behandelten Zellen eine den Kontrollzellen vergleichbare Konzentration. Es wurden zwei parallele Experimente und jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Die UV-Bestrahlung hatte in den mit Kontrollmedium behandelten Zellen zur Folge, dass diese nach 24 h im Vergleich zu den nichtbestrahlten Zellen eine leichte Erhöhung ($\sim 50\%$) im IL-6-Gehalt aufwiesen. Wie im vorigen Experiment auch führte die Behandlung mit IP ($100 \mu\text{M}$) ohne UV-Bestrahlung zu einer 2-3fachen Erhöhung des IL-6-Gehaltes. Nach Bestrahlung mit UV-Licht (30 mJ/cm^2) führte dies im Mittel zu einer 3-4fachen Erhöhung des IL-6-Gehalts in den Überständen der IP-behandelten Zellen. Zugabe des AhR-Antagonisten α NF ($10 \mu\text{M}$) zeigte keinen Effekt auf die Entzündungsreaktion im Vergleich zum Kontrollmedium (Abb. 24). Evtl. würde ein inhibierender Effekt auf die Entzündungsreaktion erst nach einer noch längeren Inkubation deutlich werden. Vielleicht ist die Konzentration von $10 \mu\text{M}$ α NF auch zu gering, um einen inhibierenden Effekt zu bewirken oder der Anstieg in der IL-6-Produktion ist nicht AhR-vermittelt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass IP eine Entzündungsreaktion bewirkt und dass diese evtl. durch zusätzliche UV-Bestrahlung noch verstärkt wird. Damit kann die Abwesenheit von Sonnenbrand in den Läsionen der Pityriasis versicolor nicht durch einen antagonistischen Effekt von IP auf den AhR erklärt werden.

2.7.2 Einfluss der Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf die Überlebensrate von HaCaT-Zellen

Um zu testen, ob die aus IP spontan generierten Substanzen eine Schutzfunktion auf die Überlebensrate von HaCaT-Zellen ausüben könnten, wurden HaCaT-Zellen mit Kontrollmedium (Kontrolle) in An- und Abwesenheit von IP für 8 Tage im Dunkeln inkubiert und dreimal (an Tag 1, 4 und 7) mit UV-Licht (20 mJ/cm^2) bestrahlt, wobei direkt nach der Bestrahlung den Zellen neues Medium angeboten wurde. Am Ende des Experimentes wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (Abb. 25).

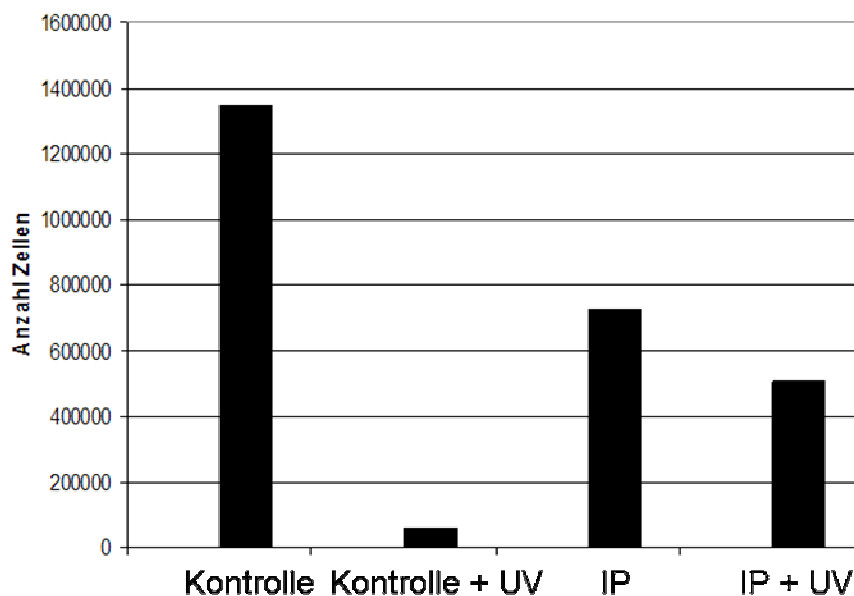


Abb. 25. Überlebensrate von HaCaT-Zellen nach Behandlung mit Kontrollmedium (K) und IP ($100 \mu\text{M}$) und mit oder ohne UV-Bestrahlung (3 mal 20 mJ/cm^2) über einen Zeitraum von 8 Tagen. Die Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt, eine ähnliche Verteilung mikroskopisch überprüft und jeweils ein Ansatz ausgezählt.

Nach 8 Tagen Inkubation wurden im Kontrollexperiment ohne UV-Bestrahlung (Kontrolle) $13,5 \cdot 10^5$ Zellen gezählt, wohingegen nur $5 \cdot 10^4$ Zellen im Kontrollexperiment mit UV-Bestrahlung (Kontrolle +UV) gezählt wurden. Damit führte die UV-Bestrahlung in Kontrollzellen zu einer 96%igen Reduktion der Zellzahl.

Die IP-behandelten Zellen (IP) zeigten nach 8 Tagen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen mit $7 \cdot 10^5$ Zellen nur eine halb so hohe Zellzahl. Interessanterweise wurden im Vergleich dazu $5 \cdot 10^5$ IP-behandelte Zellen nach UV-Exposition (IP +UV) gezählt. Damit führte die UV-Behandlung in IP-behandelten Zellen nur zu einer 30%igen Reduktion in der Zellzahl. IP oder die spontan gebildeten Substanzen scheinen also einerseits hemmend auf die Proliferation zu wirken und andererseits einen Überlebensvorteil nach UV-Exposition zu vermitteln.

2.7.3 Einfluss der Indolpyruvat-abhängigen Substanzen auf die Überlebensrate von *U. maydis*

Die Existenz eines AhRs ist bisher nur für höhere Eukaryoten wie *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorabditis elegans* beschrieben (Übersichtsartikel von Swanson und Bradfield, 2007; Abbott et al., 1995; Duncan et al., 1998; Powell-Coffman et al., 1998). Für niedere Eukaryoten wie *S. cerevisiae* oder *U. maydis* ist ein solcher Rezeptor bisher nicht bekannt. Eine BLASTX-Analyse mit der Aminosäuresequenz des humanen AhR gegen das *U. maydis*-Genom lieferte nur einen ORF (um02664) mit einem E-Wert $< 0,008$. Der humane AhR und das von um02664 kodierte Protein zeigen nur 11,3% globale AS-Identität (Programm Stretcher; <http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz>). Obwohl Um02664 als einziges *U. maydis*-Protein wie der humane AhR zugleich eine PAS (putative active site)-Domäne, die mutmaßlich in der Bindung von Liganden involviert ist und eine Zink-Finger-Domäne, die mutmaßlich in der Bindung von DNA involviert ist, besitzt, lässt dies nicht auf die Präsenz eines AhR-ähnlichen Rezeptors schließen.

Unabhängig davon sollte getestet werden, ob Vorbehandlung von *U. maydis*-Zellen mit IP evtl. eine Stressreaktion und eine erhöhte DNA-Reparaturaktivität induzieren kann, was eine erhöhte Überlebensrate gegenüber UV-Strahlung zur Folge haben könnte. Sollte außerdem die Produktion von IP für die UV-Resistenz möglicherweise grundsätzlich unabdingbar sein, so sollte die *U. maydis* 521 Δ tam1-Mutante einen Defekt in der UV-Resistenz aufweisen. Da *U. maydis* die Aminosäure Trp selbst herstellen kann, sollte der Effekt auch ohne Behandlung mit Trp sichtbar sein. Um diese Hypothesen zu testen, wurden *U. maydis*-521-Zellen (WT) und *U. maydis*- Δ tam1-Zellen (Δ tam1) in AM mit oder ohne IP über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die auf eine OD=2 eingestellten Kulturen gewaschen. Das Waschen sollte einen möglichen direkten UV-protectiven Effekt der Substanzen minimieren, wobei nicht ausgeschlossen ist, dass sich die Substanzen in die Zellwand von *U. maydis* integrieren können. Die unverdünnten Kulturen und Verdünnungen daraus (jeweils 1/10) wurden dann auf zwei AM-Platten aufgetropft. Eine dieser Platten wurde mit 40 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt.

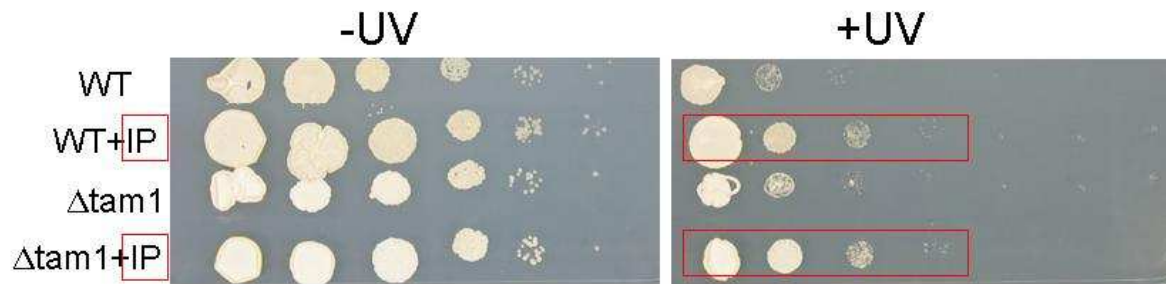


Abb. 26. IP-Vorbehandlung führte zu einer erhöhten Überlebensrate nach UV-Bestrahlung in *U. maydis*. *U. maydis*-Stämme 521 (WT), 521 Δ tam1 (Δ tam1) wurden in An- oder Abwesenheit von IP (0,8 mM) vorkultiviert, auf AM-Platten aufgetropft und danach mit UV-Licht bestrahlt oder direkt im Dunkeln inkubiert.

Die mit IP vorbehandelten Kulturen (rotes Rechteck) zeigten eine 10fach höhere Überlebensrate zeigten als die unbehandelten Kulturen (Abb. 26). Offenbar übt IP einen Schutzeffekt aus. Dieser könnte auf direkte UV-Absorption der IP-generierten Substanzen oder durch Vermittlung einer Art Stresszustand auf die Zelle zurückzuführen sein.

Hingegen hat die An- bzw. Abwesenheit der Tam1 keinen Effekt auf die Überlebensrate. Würde die Fähigkeit, Trp zu IP umzuwandeln, unter den angewandten Bedingungen eine Rolle im UV-Schutz spielen, so müssten die unbehandelten WT-Kontrollzellen nach UV-Bestrahlung eine höhere Überlebensrate aufweisen als die unbehandelten Δ tam1-Mutanten. Weiterhin habe ich die Beobachtung gemacht, dass auch Vorbehandlung mit Trp keinen Unterschied zwischen WT und Δ tam1-Mutante in Bezug auf die Überlebensrate ausmacht (nicht gezeigt). Jedoch hat Trp-Vorbehandlung ebenfalls wie IP-Vorbehandlung einen positiven Effekt auf die Überlebensrate.

3 Diskussion Teil 1

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den biochemischen Weg zu identifizieren, der zur Produktion der neuartigen Indolpigmente führt, die erstmals von *M. furfur* isoliert worden waren. Da *M. furfur* genetisch nicht zugänglich war, wurde der genetisch zugängliche, nah verwandte Organismus *U. maydis* als Modell benutzt. Es konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* dieselben Substanzen wie *M. furfur* produziert, wenn Trp als einzige Stickstoffquelle angeboten wird. Durch einen revers-genetischen Ansatz konnte die Trp-Aminotransferase Tam1 als das für die Trp-abhängige Pigmentbildung verantwortliche Hauptenzym identifiziert werden. Wir machten dann die unerwartete Entdeckung, dass alle folgenden Reaktionen, die für die Bildung der Indolpigmente PCit, PyA, PitB und PitC aus IP notwendig sind, spontan ohne zusätzliche Hilfe von Enzymen abläuft. Damit ist die Trp-Aminotransferase als einziges biosynthetisches Enzym für die Pigmentbildung aus Trp verantwortlich. Die Umwandlung aus Trp zu farbigen Substanzen gefolgt von einer spontanen Generierung von dunkelroten Pigmenten wurde zunächst in *Klebsiella aerogenes* (Paris and Magasanik, 1981) beobachtet. Eine ähnliche Beobachtung wurde gemacht, als nach Liganden des AhR von Säugetierzellen gesucht wurde (Bittinger *et al.*, 2003). Nichtsdestotrotz verblieb die exakte Struktur dieser spontan generierten Pigmente sowie der Mechanismus dieser Reaktion ungeklärt.

3.1 Wie könnte der Mechanismus aussehen, der zur spontanen Bildung der Pigmente aus IP führt?

Pityriacitrin wurde nur generiert, wenn die sterilen Lösungen sowohl Trp als auch IP enthielten. Die spontane Generierung von PCit könnte mit der Bildung des Imins (**1**) durch Kondensierung von Trp und IP beginnen (Abb. 27). An diesem Punkt könnte **1** doppelt oxidativ decarboxyliert werden, wobei sich eine Ringstruktur ausbildet, die zum Intermediat **2** führt. Die Decarboxylierungsreaktionen werden möglicherweise durch reaktive Sauerstoffspezies katalysiert, wie dies bereits für die spontane Decarboxylierung von 2-Oxosäuren beschrieben wurde (Vlessis *et al.*, 1990). Im letzten Schritt könnte die benzolische CH₂-Gruppe oxidiert werden, was zur Bildung von PCit führen könnte. Für die Generierung von PyA ist nur die Anwesenheit von IP erforderlich (Abb. 27). Daher wird IP möglicherweise nichtenzymatisch zu IAald (**3**) decarboxyliert. Spontane Decarboxylierung von IP zu IAald wurde bereits beschrieben (Kaper and Veldstra, 1958; Abb. 27). An der

benzolischen Position am C-2 des Intermediats **3** könnte sich ein relativ stabiles Radikal ausbilden. Zwei dieser Radikale würden dann miteinander reagieren, was nach einer zweiten Oxidation zu **4** führt. Dann würden die Aldehyd-Gruppen von **4** oxidiert werden. Nach einem formalen Verlust von Wasser würde PyA generiert werden (Abb. 27). Im Zuge der Reaktionen, die von PCit zu PyA führen, ist das Auftreten von Radikalen relativ wahrscheinlich.

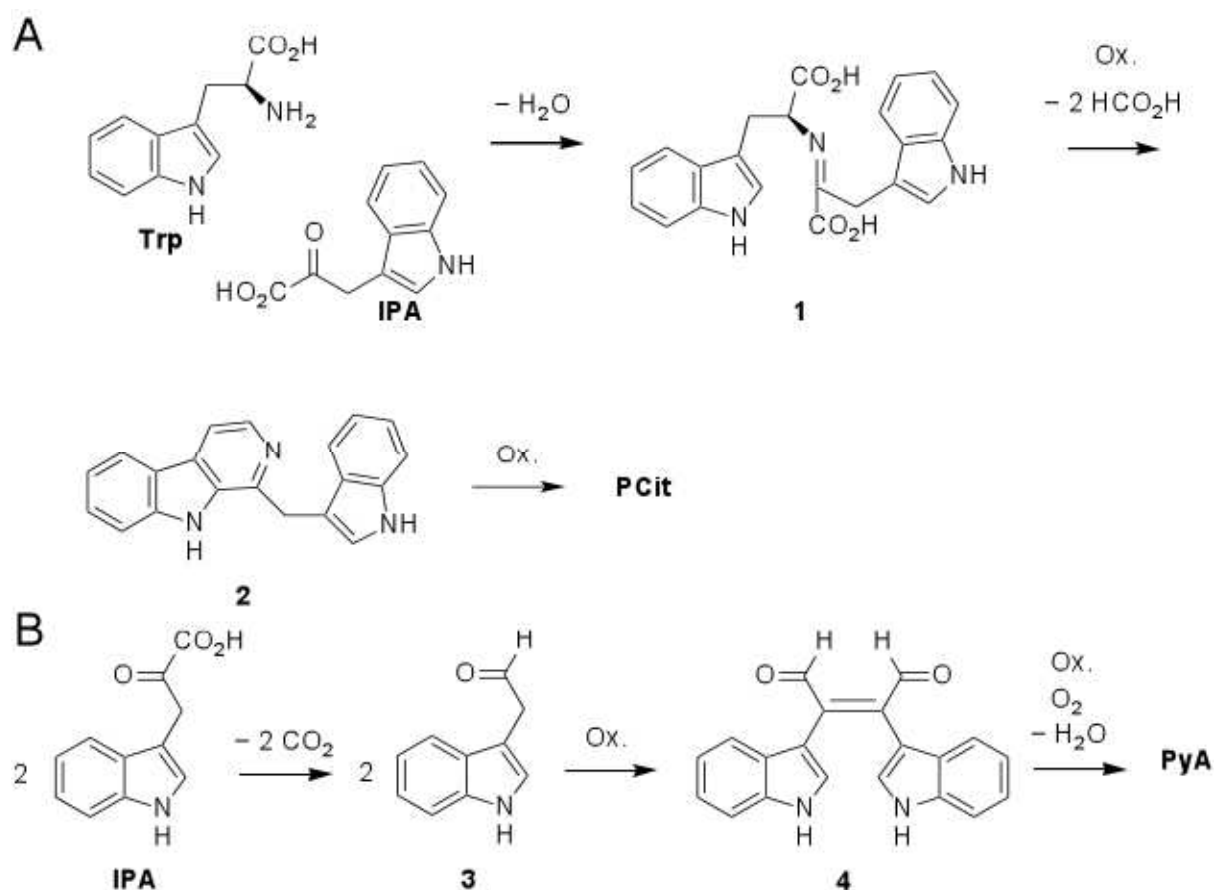


Abb. 27. Vorgeschlagenes Modell der Spontansynthese von PyA (A) und PCit (B) aus IP (nach P. Spiteller, München).

Die Involvierung von molekularem Sauerstoff in dieser Reaktion wird auch durch die Experimente von Bradfield und Mitarbeitern unterstützt, da diese herausgefunden haben, dass IP schneller zu Pigmenten umgewandelt wird, wenn Sauerstoff durch die Lösung geleitet wird (Bittinger et al., 2003). Auch die spontane Bildung von PitC und PitB in sterilen Lösungen von Trp und IP sollte sowohl Oxidations- als auch Reduktionsreaktionen involvieren, aber deren exakte Mechanismen, speziell die Reaktionen, die von IP (und Trp) zum vorgeschlagenen Vorläufermolekül 4,5-Bis-(1H-indol-3-yl)-Cyclopent-4-en-1,2,3-Trion (Irlinger et al., 2004) führen, verbleiben ungelöst.

Wie auch immer der Mechanismus aussehen mag, die spontane Reaktion von Trp und IP hatte die Bildung von Hunderten bisher unbekannter Substanzen zur Folge, worunter sich auch PCit, PyA, PitB und PitC befanden.

3.2 Warum unterscheiden sich die Pigmentprofile von *M. furfur* und *U. maydis*, wenn die meisten Pigmente spontan aus IP generiert werden?

Zu Beginn des Projekts wurden mittels UV-Mutagenese 45 Mutanten generiert, die eine zum Wildtyp unterschiedliche Koloniefarbe aufwiesen. Ungefähr die Hälfte der isolierten Mutanten zeigte eine hellere Koloniefärbung auf Trp-Platten als der Wildtyp. Für einige der Mutanten, die eine gelbliche Färbung auf Trp-Platten zeigten, konnten individuell betroffene Gene identifiziert werden, die eine putative Rolle im Aminosäuremetabolismus spielen. Angesichts des hier präsentierten Weges der Pigmentbiosynthese aus Trp ist es sehr wahrscheinlich, dass die Spontanreaktionen nach der Generierung von IP auch andere Aminosäuren sowie deren respektive Oxosäuren involvieren können. Von allen generierten Substanzen, die auf der DC-Platte sichtbar sind (Abb. 16A, Wildtyp), ist die Identität nur von sehr wenigen bekannt. Es ist möglich, dass die anderen Substanzen ebenfalls spontan durch die Reaktion von IP mit anderen 2-Oxosäuren entstehen (Garbe et al., 2000). Die relativen Mengen und die Pigmentzusammensetzung würden dann von der Verfügbarkeit von verschiedenen Aminosäuren abhängen, die unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur), in verschiedenen Umgebungen und in verschiedenen Stämmen variieren könnten. Die Verfügbarkeit unterschiedlicher Aminosäuren könnte möglicherweise die Unterschiede in den Pigmentspektren von *U. maydis* und *M. furfur* erklären (Abb. 11).

3.3 Warum ist die sir1 $\Delta^{1054-1499}$ -Mutante in der Pigmentbildung auf Trp beeinträchtigt?

Nach der anfänglichen UV-Mutagenese, die die Identifikation von pigmentdefizienten Mutanten zum Ziel hatte, konnten nur sehr wenige (<0,05%) Mutanten mit einem kompletten Pigmentverlust identifiziert werden. Dies unterstützt das Ergebnis, dass nur ein einziges biosynthetisches Enzym für die Pigmentproduktion notwendig ist. Überraschenderweise war in allen identifizierten Mutanten dasselbe Gen betroffen, welches für die Sulfitreduktase Sir1 kodiert. Wir konnten zeigen, dass die Stämme, die eine Deletion in der C-terminalen Domäne von Sir1 trugen, auxotroph für Met waren. Wachstums- und Pigmentierungsdefekte konnten durch die Zugabe von Met, Cystein oder Natriumsulfid aufgehoben werden. Dies deutete darauf hin, dass das Sir1-Protein in die Generierung von reduziertem Schwefel involviert ist

und dass der Stamm, der eine Deletion in der C-terminalen Domäne von Sir1 trägt, in der Biosynthese von Schwefel-enthaltenden Aminosäuren beeinträchtigt ist. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das einzige Enzym, welches für die Pigmentbildung verantwortlich ist, Tam1 ist. Ein Hinweis, dass Tam1 die Verbindung zwischen Pigmentproduktion und Schwefelmetabolismus darstellen könnte, stammt aus Arbeiten zu Aro8 und Aro9 aus *S. cerevisiae*. Sowohl Aro8 als auch Aro9 tragen zum Aminogruppentransfer von Met zu PPy bei (Urrestarazu et al., 1998). Fütterungsexperimente deuteten darauf hin, dass Tam1 aus *U. maydis* zusätzlich OMBA als Substrat für die Generierung von Met benutzen kann (Abb. 18). Dies konnte durch *in vitro*-Aktivitäts-Versuche bestätigt werden, bei denen aufgereinigte Tam1 eingesetzt worden war (Abb. 21) Wie auch in *S. cerevisiae* konnte die Aminierung von OMBA durch Tam1 an die Deaminierung von Phe zu PPy gekoppelt werden. Interessanterweise zeigten die *in vitro*-Experimente, dass Tam1 auch die Aminierung von OMBA direkt an die Trp-Deaminierung koppeln kann (Abb. 21) Daher gibt es zwei Möglichkeiten, den Schwefelmetabolismus an die Pigmentproduktion zu koppeln (Abb. 28). Die erste Möglichkeit ist durch die Eigenschaft von Tam1 gegeben, direkt OMBA als Aminogruppenakzeptor für die Trp-Deaminierung verwenden zu können (Reaktion 1, Abb. 28). Der zweite Weg koppelt die OMBA-Aminierung indirekt an die Trp-Deaminierung. In diesem Schaltkreis wird die Trp-Deaminierung zu IP durch Tam1 an die Aminierung von PPy zu Phe gekoppelt (Reaktion 2, Abb. 28). Eine IP-Akkumulation würde dann in Abhängigkeit von der Regeneration von PPy durch Tam1-katalysierten Aminotransfer von Phe zu OMBA stehen (Reaktion 3, Abb. 28).

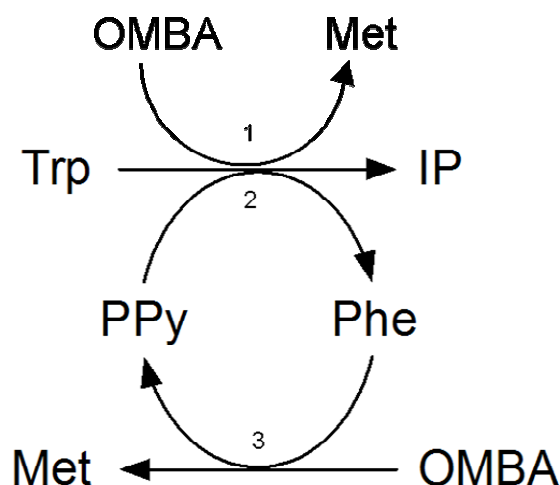


Abb. 28. Tam1-katalysierte Reaktionen verknüpfen die Trp-Umsetzung zu IP sowohl direkt als auch indirekt an die Aminierung von OMBA. Tam1 kann OMBA direkt als Aminogruppenakzeptor für eine Trp-Deaminierung benutzen (1). Trp-Deaminierung ist auch indirekt von der OMBA-Aminierung durch Aminogruppentransfer von Trp auf PPy (2) abhängig und PPy-Regenerierung durch Tam1-katalysierten Aminogruppentransfer von Phe zu OMBA (3). In Abwesenheit von OMBA ist der PPy-Gehalt limitiert und bestimmt den Gehalt an IP, der durch einen Überschuss an Trp von Tam1 gebildet wird.

In der $\text{sir1}\Delta^{1054-1499}$ -Mutante ist OMBA, dessen Anwesenheit von einer funktionalen Sulfitreduktase abhängig ist, nicht in ausreichenden Mengen vorhanden, um entweder als direkter Aminogruppenakzeptor zu fungieren oder um das PPy-Recycling zu unterstützen. Aus diesen Überlegungen folgt, dass die Pigmentbildung zum Erliegen kommt, sobald verfügbare Aminogruppenakzeptoren aufgebraucht sind. In Übereinstimmung damit konnte die Zugabe von PPy zu Trp-Platten wieder zu einer Pigmentbildung in den $\text{Sir}\Delta^{1054-1499}$ -Mutanten führen (Abb. 29).



Abb. 29. Der Pigmentproduktionsdefekt der 521Sir Δ 1054-1499-Mutante wurde durch die Zugabe von PPy komplementiert. Eine Übernachtskultur von 521Sir Δ 1054-1499 wurde gründlich mit Wasser gewaschen und auf Trp-Agar ausplattiert, ohne (links) oder mit (rechts) 1 mM PPy.

3.4 Könnten die IP-generierten Substanzen als Arylhydrocarbon-Rezeptor-Agonisten Symptome der Pityriasis versicolor erklären?

Es ist bekannt, dass wässrige Trp-Lösungen spontan generierte Photoprodukte enthalten. Eines von ihnen, 6-Formylindol[3,2-b]Carbazol (FICZ), wurde umfangreich charakterisiert (Rannug et al., 1995), und es wurde gezeigt, dass es sehr effizient an den AhR von Säugetierzellen binden kann (Wie et al., 1998; Bergander et al., 2004). Bindung von FICZ an den AhR führt zu einer Translokation des AhR aus dem Zytoplasma in den Nukleus (Okey et al., 1994), wo es die Generierung von großen Mengen CYP1A1 (Fritsche et al., 2007) fördert. CYP1A1 ist eine Cytochrom-P450-Monooxygenase mit einer wichtigen Rolle in der chemischen Karzinogenese (Nebert und Dalton, 2006). Es wurde gezeigt, dass AhR-vermittelte CYP1A1-Aktivität durch die Anwesenheit von FICZ im Kulturmedium stimuliert wird, das spontan aus Trp entsteht (Oberg et al., 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Anwesenheit von FICZ in Extrakten aus sterilen Platten, die Trp und IP enthielten, demonstriert werden (s. Material und Methoden). Zusätzlich zu FICZ konnten weitere Substanzen in Extrakten aus mit *M. furfur* bewachsenen Trp-Agarplatten identifiziert werden, die das Potential besitzen, an den AhR zu binden. Für Malassezin wurde bereits eine Funktion als AhR-Agonist beschrieben (Wille et al., 2001), und darüber hinaus weisen einige der identifizierten Indolcarbazole Strukturen auf, die dem FICZ sehr ähnlich sind (Irlinger et al., 2005). Diese könnten ebenfalls vom AhR gebunden werden, da der AhR polyzyklische, planare, aromatische Kohlenwasserstoffe bindet (Bittinger et al., 2003). Interessanterweise konnten Bradfield und Mitarbeiter zeigen, dass IP als Proagonist des AhR wirkt und dass IP

spontan zu einer ganzen Reihe an Substanzen weiterreagiert, die als Liganden des AhR Bedeutung haben könnten und als Agonisten zur Aktivierung des AhR beitragen (Bittinger et al., 2003). Sie konnten zeigen, dass längere Inkubationszeiten von IP in wässriger Lösung in einer dunkleren Farbe der Lösungen resultierte, und dass dunklere Lösungen potenter in der Aktivierung des AhR waren (Bittinger et al., 2003).

Vor kurzem wurde gezeigt, dass FICZ als eines der langgesuchten zytoplasmatischen UV-B-Stress-Moleküle dient, die eine DNA-Schaden-unabhängige Stressantwort durch Bindung an den AhR induzieren (Fritsche et al., 2007). Es könnte also sein, dass *M. furfur* auf der menschlichen Haut Trp zu IP umsetzt und dass IP dann spontan zur Bildung von Agonisten des AhR reagiert. Agonistenbindung des AhR könnte in der Aktivierung der AhR-vermittelten UV-B-Stressantwort resultieren und könnte in Kombination mit den UV-absorbierenden Substanzen evtl. zu der beobachteten UV-Resistenz in Läsionen der Pityriasis versicolor beitragen. Versuche zur Überlebensrate von humanen Keratinozyten nach UV-Bestrahlung am Beispiel von HaCaT-Zellen hatten eine Verbesserung der Überlebensrate nach Vorbehandlung mit IP zur Folge (Abb. 25). IP generierte Substanzen könnten durch ihre Funktion als AhR-Agonisten den UV-Schutz auf HaCaT-Zellen erklären. Ein aktivierter AhR kann in HaCaT-Zellen einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase induzieren (Kalmes et al., 2006), was das verminderte Proliferationsvermögen (Abb. 25) erklären könnte. Humane Keratinozyten, die mit aus Läsionen der Pityriasis versicolor isolierten *Malassezia*-Spezies kokultiviert wurden, hatten im Vergleich zu steril kultivierten Keratinozyten ebenfalls ein vermindertes Proliferationsvermögen (Cui et al., 2007), was evtl. durch einen IP-aktivierten AhR-abhängigen Zellzyklusarrest vermittelt sein könnte. Ein Zellzyklusarrest der Keratinozyten in der G1-Phase aktiviert den „non-homologous-end-joining“ (NHEJ) DNA-Reparaturmechanismus (Übersichtsartikel von Delacote et al., 2008), der durch UV-Stress verursachte DNA-Doppelstrangbrüche erfolgreich beseitigen kann.

Nichtsdestotrotz könnte es auch möglich sein, dass die Tryptophan- und IP-abhängigen Pigmente selber UV-absorbierend wirken (Mayser et al., 2002), obwohl zumindest für Pityriacitrin ein vernachlässigbarer Sonnenschutzfaktor gemessen wurde (Gambichler et al., 2007). Ein direkter UV-Schutz durch solche UV-absorbierenden Stoffe könnte im HaCaT-Bestrahlungsexperiment umso deutlicher geworden sein, weil sich auf Grund der Inkubation von drei Tagen im selben Medium sehr viele bisher uncharakterisierte Pigmente bilden konnten. Vor dem Hintergrund eines möglichen UV-protektiven Effektes ist es interessant, dass IPA als Sonnenschutzmittel bereits patentiert ist (Politi et al., 1992). Auch hierbei

könnte der Sonnenschutz durch Degradationsprodukte entstehen, die spontan von IPA gebildet werden.

Während der UV-Schutz in Läsionen der Pityriasis versicolor durch die Präsenz von AhR-Agonisten erklärt werden kann, so kann die fehlende Entzündungsreaktion (Abb. 30) nicht auf die Produktion von AhR-Agonisten zurückgeführt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führte die Präsenz von IP generierten Substanzen zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion in menschlichen Keratinozyten (HaCaT-Zellen; Abb. 24), was zwar den Effekt der aus IP generierten Substanzen als AhR-Agonisten unterstützt, nicht aber die fehlende Entzündungsreaktion in Läsionen der PV. Es wurde beschrieben, dass die Pityriarubine als potentielle Proteinkinase C-Inhibitoren die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in humanen neutrophilen Granulozyten unterdrücken können (Krämer et al., 2005a). In Schnitten aus Hautläsionen der Pityriasis versicolor findet sich jedoch kein granulozytäres Infiltrat (Wroblewski et al., 2005), womit ein direkter Effekt der Substanzen auf die Granulozyten unwahrscheinlich wird. Weiterhin finden sich widersprüchliche Literaturdaten, die einerseits belegen, dass Kokultivierung von Keratinozyten mit *M. furfur* eine IL-6-Produktion supprimiert (Kesavan et al., 1998; Watanabe et al., 2001; Baroni et al., 2001), andererseits, dass Kokultivierung von Keratinozyten mit aus Läsionen der Pityriasis versicolor isolierten *Malassezia*-Spezies eine entzündungsassoziierte IL-6-Produktion fördert (Cui et al., 2007). Darüber hinaus führte *M. furfur*-Infektion von monocytären und granulozytären Zelllinien in diesen ebenfalls zu einer erhöhten IL-6 Produktion (Suzuki et al., 2000). Genauere Studien sind erforderlich, um herauszufinden, unter welchen Bedingungen eine IL-6-Produktion gefördert wird, und unter welchen Bedingungen sie unterdrückt wird. Die aus IP generierten Substanzen unterstützen zumindest nicht die beschriebene Suppression der IL-6-Produktion nach Infektion von Keratinozyten mit *M. furfur* (Abb. 24).

Ein weiteres Symptom der Pityriasis versicolor ist die Demelanisierung der betroffenen Hautareale. Die Demelanisierung könnte eine Folge der Präsenz von AhR-Agonisten sein. Melanozyten werden nach Behandlung mit Malassezin (einem Metaboliten aus dem Trp-Stoffwechsel) aus *M. furfur* apoptotisch (G.-J. Toeppler, pers. Mitteilung). Auch Apoptose kann über den AhR durch Bindung an den Promoter des proapoptotischen Gens *Bax* vermittelt werden (Abb. 30; Matzuk, 2001; Detmar, 2006). Ein apoptotischer Effekt auf Keratinozyten wurde in der vorliegenden Studie unter den angewendeten Bedingungen nicht beobachtet. Es müsste daher getestet werden, inwieweit Melanozyten susceptibler als Keratinozyten für die apoptotischen Effekte der IP-generierten Substanzen sind.

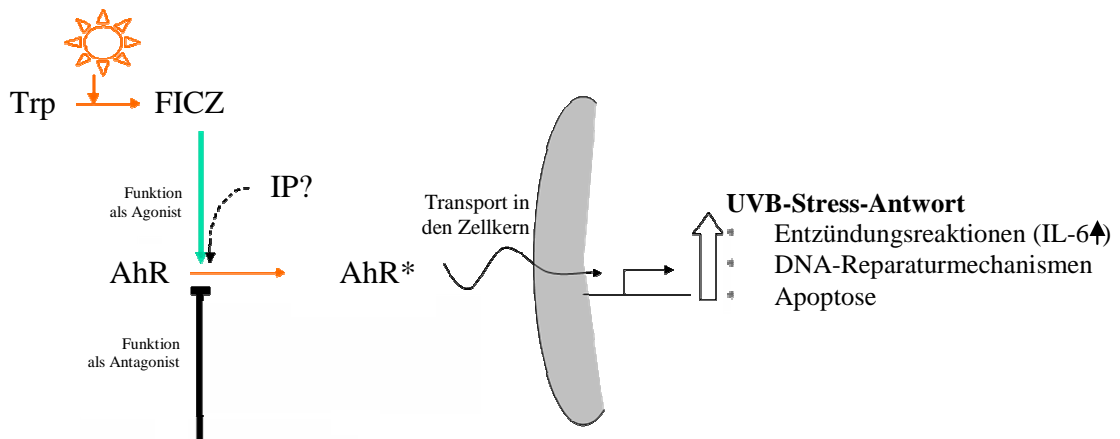


Abb. 30. Mögliche Funktionen der aus IP spontan gebildeten Substanzen auf die Aktivität des AhR und mögliche daraus resultierende Folgen. Als Beispiel für einen hochpotenten AhR-Agonisten dient das Photoprodukt von Trp (FICZ), welches spontan durch Lichtbestrahlung von Trp-Lösungen entsteht. Der in einem Komplex vorliegende cytosolische AhR kann durch FICZ gebunden und damit aktiviert werden. Dabei wird der AhR aus dem Komplex herausgelöst und wandert in den Zellkern, wo er dann als Transkriptionsfaktor an verschiedene Promotoren bindet und die Transkription der zugehörigen in der UV-B-Stress-Antwort involvierten Gene aktiviert. Ein AhR-Antagonist würde die Translokation des AhR in den Zellkern blockieren. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verhalten sich die aus IP spontan generierten Substanzen wie AhR-Agonisten.

3.5 Können biologisch aktive Sekundärmetabolite spontan aus IP gebildet werden?

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese der in *M. furfur* produzierten Pigmente untersucht, die mit einer Funktion in der Pityriasis versicolor assoziiert sein könnten. Da die meisten, wenn nicht alle, dieser Substanzen spontan aus IP zu entstehen schienen, stellt sich die Frage, ob solche Substanzen biologische Effekte haben können.

Die Generierung von Chrompyrrolsäure, einem Vorläufer der antitumorigenen Indol-Carbazole Staurosporin und Rebeccamycin, geschieht durch oxidative Dimerisierung von oxidiertem Trp und ist abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff, aber unabhängig von der Anwesenheit von Enzymen, sobald sich IPA bildet (Balibar and Walsh, 2006, Howard-Jones and Walsh, 2006). Darüber hinaus tragen weitere nichtenzymatische Reaktionen nach der Bildung von Chrompyrrolsäure zur Biosynthese von Staurosporin und Rebeccamycin bei (Howard-Jones und Walsh, 2007). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte auch Chrompyrrolsäure unter den Substanzen aus sterilen Agar-Platten gefunden werden, die spontan aus Trp und IP generiert werden (s. Material und Methoden).

Ein weiteres wichtiges Molekül, welches sich spontan aus IP bilden kann, ist IAA (Kaper und Veldstra, 1958; Basse et al., 1996; Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit). Für *A. thaliana* wurde gezeigt, dass ein Syntheseweg von IAA, der für eine schnelle, lokalspezifische und massenhafte Anreicherung dieses Wachstumshormons sorgt, über IP abläuft (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008). Wenn die Trp-Aminotransferase SAV3

deletiert wird, führt dies zu einer 40%igen Verminderung des Auxin-Gehalts in *A. thaliana*. (Tao et al., 2008). SAV3-Überproduktion hingegen führt zu keiner Erhöhung des Auxin-Gehalts. Aus Bakterien ist das Enzym IP-Decarboxylase bekannt, welches als regulatorische Einheit die IP-Umsetzung zu IAA begrenzen kann (Koga et al., 1995). Daher wird die Anwesenheit einer IP-Decarboxylase auch in *A. thaliana* vermutet (Tao et al., 2008). Nichtsdestotrotz könnte die fehlende Steigerung der Auxin-Produktion nach SAV3-Überproduktion (Tao et al., 2008) auch auf die begrenzte Menge an Trp zurückzuführen sein, was weitere spontane Prozesse nicht ausschließt. In der vorliegenden Arbeit hatte ein *U. maydis* 521 Δ um03992-Stamm, dem das Gen für die mutmaßliche IP-Decarboxylase fehlt, keinen Effekt auf den Gehalt von IP oder IAA in Trp-angereichertem Vollmedium (nicht dargestellt). IAA spielt eine wichtige Rolle in allen Aspekten des Pflanzenwachstums und ihrer Entwicklung (Teale et al., 2006). Daher wäre es wahrscheinlich, dass IP-unabhängige einen größeren Einfluss als IP-abhängige IAA-Synthesewege haben, um spontane und nicht zeitgerechte Generierung dieses wichtigen Pflanzenwachstumshormons zu unterdrücken (Teale et al., 2006).

Die IAA-Menge in Tumor-Gewebe von *U. maydis*-infizierten Maispflanzen ist erhöht. IAA-Produktion durch *U. maydis* wurde bereits mit Tumor-Bildung in Verbindung gebracht (Wolf, 1952), wobei die IAA-Biosynthese als Resultat der Aktivität der IAAd-Dehydrogenasen Iad1 und Iad2 betrachtet wurde. Nichtsdestotrotz waren die *iad1* Δ *iad2* Δ -Doppeldeletionsmutanten in der Virulenz unbeeinträchtigt (Basse et al., 1996; Reineke et al., 2008). Die Deletion von *tam1* führte ebenfalls zu keiner Reduktion in der Virulenz des solopathogenen *U. maydis* SG200-Stammes und eine SG200*tam1* Δ *iad1* Δ *iad2* Δ -Mutante zeigte ebenfalls keinen reduzierten Virulenzphänotyp (Reineke et al., 2008). Dennoch war der IAA-Gehalt im Tumormaterial von mit *tam1* Δ -Stämmen infizierten Pflanzen reduziert, während Deletion von *iad1* und *iad2* keinen Einfluss auf den IAA-Gehalt hatte (Reineke et al., 2008). Dies könnte bedeuten, dass Tam1-katalysierte Deaminierung von Trp zu IP auch eine Rolle in der Generierung von IAA in *U. maydis*-infiziertem Pflanzengewebe spielt.

Offenbar können spontan aus IP generierte Substanzen biologische Systeme auf verschiedene Art und Weise beeinflussen. Dies ist am Beispiel der spontanen Generierung von Chrompyrrolsäure verdeutlicht, welche in die Generierung von antitumorigenen Substanzen involviert ist und durch die spontane Generierung des Pflanzen-Hormons IAA aus IP. Daher können spontan aus IP generierte Substanzen einen starken Einfluss auf verschiedene fundamentale Prozesse haben. Der Nachweis der Beteiligung spontaner Prozesse an der

Bildung der durch *M. furfur* und *U. maydis* aus Trp gebildeten Pigmente liefert einen wichtigen Beitrag zu diesem hochaktuellen Forschungsgebiet.

4 Einleitung Teil 2

4.1 Wirtsspezifität in phytopathogenen Pilzen

Die Wirtsspezifität bezeichnet den spezifischen Anpassungsgrad eines Parasiten oder Symbionten an eine bestimmte Wirtsart. In phytopathogenen Pilzen kann die Wirtsspezifität sehr variieren. Sowohl unter den nekrotrophen Pilzen, die sich von getöteten Zellen der Wirtspflanze ernähren, den biotrophen Pilzen, die sich ausschließlich von lebenden Zellen ihrer Wirtspflanze (Mendgen et al., 2002) ernähren und über keine aggressiven Virulenz-Strategien zur Zerstörung ihrer Wirtspflanzen verfügen, als auch unter den hemibiotrophen Pilzen, die sich zunächst biotroph in ihrer Wirtspflanze vermehren, um die Pflanzenzellen dann abzutöten und als nekrotrophe Parasiten weiterzuwachsen, gibt es Parasiten mit hoher als auch mit geringer Wirtsspezifität. Wirtsspezifität wird je nach Anpassung durch verschiedene Strategien erreicht, in die verschiedene Effektoren involviert sind. Effektoren sind definiert als Moleküle, die die Wirtszellenstruktur und –funktion manipulieren, wobei entweder eine Infektion erleichtert wird (Virulenzfaktoren oder Toxine) und/oder durch Induktion einer Abwehrreaktion (Avirulenzfaktoren oder Elizitoren) eine Infektion erschwert wird (Kamoun, 2006). Ein solcher Effektor-assoziiertes Mechanismus kann mit der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1946) beschrieben werden, die besagt, dass der Ausgang einer Wirt/Pathogen-Interaktion durch ein Paar komplementärer Genprodukte bestimmt wird, einem Resistenzgen des Wirtes (R-Gen) und einem Avirulenzgen (*avr*-Gen) des Pathogens. Eine aktuellere Auffassung einer durch Effektoren vermittelten Pilz-Pflanze-Interaktion wird durch das Prinzip der Wächter- („Guard“-)-Hypothese beschrieben. Dabei wird angenommen, dass die R-Proteine des Wirtes die Zielproteine der Effektoren „bewachen“, wobei sie den zugehörigen Effektor indirekt durch Effektor-generierte enzymatische Produkte detektieren können (Van der Biezen und Jones, 1998). Im Verlauf der Ko-Evolution von pilzlichen Pathogenen und ihrer Wirtspflanzen kommt es zu einem Selektionsdruck auf Veränderung der Effektoren, um der Erkennung durch die Pflanzenabwehr zu entgehen. Dies führt zu einem Selektionsdruck auf Anpassung der pflanzlichen R-Proteine, um die veränderten Effektoren zu erkennen. Dieses gegenseitige Wettrüsten im Verlaufe der Evolution wurde als „arms race“ bezeichnet (Birch et al., 2006), und im „Zigzag“-Modell (Jones und Dangl, 2006) beschrieben.

4.1.1 Wirtsspezifität durch wirtsselektive Toxine

Ein verbreiteter Mechanismus, der phytopathogenen Pilzen eine Spezifität für verschiedene Wirte erlaubt, ist die Produktion wirtsspezifischer Toxine („host selective toxins“, HSTs). Vom nekrotrophen Schwärzepilz *Alternaria alternata* existieren verschiedene Pathotypen, in denen durch wirtsselektive Toxine Wirtselektion von Mandarine, Apfel, Birne oder Erdbeere determiniert wird (Thomma, 2003). So produziert der Birnenpathotyp beispielsweise AK-Toxin, der Mandarinenpathotyp AF-Toxin und der Erdbeerpathotyp ACT-Toxin. Alle für die Toxinproduktion benötigten Gene erscheinen in Clustern, einige sogar auf einem konditionell verzichtbaren (CD)-Chromosom (Tanaka und Tsuge, 2000). Da für *A. alternata* bisher keine sexuelle Entwicklung gezeigt wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Toxingene durch horizontalen Gentransfer von CD-Chromosomen akquiriert wurden.

Für den nekrotrophen Ascomycet *Pyrenophora tritici-repentis*, einem schwachen Pathogen bestimmter Weizensorten, konnte gezeigt werden, dass Akquisition eines HSTs seine Virulenz dramatisch erhöhte und die Nutzung anderer Weizensorten als Wirt erlaubte (Friesen et al., 2006). Das HST wird von dem Gen *toxA* kodiert, das *P. tritici-repentis* durch horizontalen Gentransfer (HGT) von dem nekrotrophen Weizenschädling *Stagonospora nodorum* erhalten hat (Friesen et al., 2006). Das Gen *toxA* kodiert für ein Protein mit einer Signalsequenz für den sekretorischen Weg (Ballance et al., 1996; Ciuffetti et al., 1997) und ist in der Lage, die Pflanzen-Plasmamembran zu überwinden und im Zellinneren in Zellorganellen zu lokalisieren (Manning und Ciuffetti, 2005). Das reife Protein enthält ein N-terminales Pyroglutamat (Tuori et al., 1995; 2000). Dieser Rest reduziert die Suszeptibilität des Proteins gegenüber Aminopeptidasen (Loe et al., 2006) und stabilisiert die C-terminale Disulfid-Bindung (Tuori et al., 2000). In dem *Cochliobolus heterostrophus* T-Pathotyp gibt es drei Gene, die für die Generierung des wirtsselektiven T-Toxins verantwortlich sind, welches mit einer hohen Virulenz auf einigen Maisgenotypen assoziiert ist. Diese Gene sind abwesend im O-Pathotyp, der nicht Mais infiziert (Baker et al., 2006). Von einem der für die Generierung des T-Toxins wichtigen Gene, *pks1*, existiert ein Ortholog im Ascomycet *Mycosphaerella zeae-maydis*, (ebenfalls ein Maispathogen), was ein Indiz für horizontalen Gentransfer sein könnte (Baker et al., 2006).

4.1.2 Wirtsspezifität durch Detoxifizierungsstrategien

Der nekrotrophe Pilz *Nectria haematococca* trägt Gene, die für Pathogenität auf Erbse benötigt werden, auf einem 1,6 Mb großen CD-Chromosom. Für diese Gene wurde gezeigt, dass sie nach individueller Transformation in einen *N. haematococca*-Stamm, dem dieses

Chromosom fehlt, die Virulenz auf Erbse verstärken. Eines dieser Gene, *PEP1* kodiert für einen „Multidrug“ Transporter, und ein anderes, *PDA1*, kodiert für eine Pisatin-Demethylase, die das in Wurzeln der Erbse produzierte Phytoalexin Pisatin detoxifiziert (Han et al., 2001). In diesem Fall spielen Enzyme eine Rolle als Wirtsspezifitätsfaktoren, die Toxine der Pflanze detoxifizieren können. Auch in diesem Fall wurde die Verbreitung wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer des CD-Chromosoms vermittelt (Funnell und VanEtten, 2002).

4.1.3 Geringe Wirtsspezifität durch Induktion eines Pflanzen-generierten oxidativen „Burst“

Ein bekanntes Beispiel für einen nekrotrophen Pilz mit einem sehr breiten Wirtsspektrum ist der Ascomycet *Botrytis cinerea*. *B. cinerea* kann über 235 Pflanzen (Dikotyledonen und Blumenkronen-tragende Monokotyledonen) befallen und verursacht die sog. Grauschimmelfäule (Hennebert, 1973). *B. cinerea* kann die Wirtszellen durch die Produktion von Toxinen und durch die Induktion eines Pflanzen-generierten oxidativen „Bursts“ töten (Govrin und Levine, 2000; Govrin et al., 2006). Letzterer wird durch pilzliche Elizitoren hervorgerufen, die von der Pflanze erkannt werden (Govrin und Levine, 2000; Govrin et al., 2006). Ein solcher Elizitor ist z. B. die Endopolygalacturonase 1 (BcPG1), die in Wein die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies – unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität – hervorruft (Poinssot et al., 2003). Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies hat zur Folge, dass in der Pflanze pathogenitätsabhängige (*pathogen related*, PR) Gene hochreguliert werden, die eine Nekrose des Pflanzenmaterials zur Folge haben (Govrin et al., 2006). Damit werden durch diese Elizitoren Abwehrmechanismen in der Pflanze induziert, die dem Pilz wiederum eine erfolgreiche Progression und Kolonisierung ermöglichen. *B. cinerea* ist durch Sekretion vieler degradierender Enzyme an eine saprophytische Lebensweise angepasst und kann sich von verschiedenen toten Pflanzengeweben ernähren (Choquer et al., 2007). Das große Wirtsspektrum von *B. cinerea* könnte daher in der Ausnutzung der basalen Immunantwort der Pflanze durch den Pilz begründet sein, die Nekrose als vermeintliche Abwehrstrategie induziert. Resistenzstrategien der Pflanze gegen *B. cinerea* beinhalten die Unterdrückung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie am Beispiel der in der HR geschwächten *Arabidopsis thaliana* *dnd1*- und *dnd2*-Mutanten gezeigt werden konnte. *dnd1*- und *dnd2*-Mutanten haben einen Defekt in zyklischen Nukleotid-assoziierten Kationenkanälen, die eine Rolle in der hypersensitiven Antwort spielen und sind resistent gegenüber *B. cinerea* (Jurkowski et al., 2004; Genger et al., 2008;). Eine andere Resistenzstrategie läuft über die Erkennung von Oligogalacturoniden (OG) ab, die von

pathogenen Polygalacturonasen aus der Pflanzenzellwand gelöst werden. OGs lösen Signalwege aus, die unabhängig von Salicylsäure, Jasmonat und Ethylen ablaufen. Ein Gen, welches nach Induktion dieses Signalwegs hochreguliert wird, ist *pad3* (*phytoalexin deficient*) (Ferrari et al., 2007).

4.1.4 Wirtsspezifität durch kleine sekretierte Proteine

Von *Fusarium oxysporum* gibt es 120 Pathotypen („formae speciales“), die an 120 verschiedene Wirtspflanzen angepasst sind. Während auf der Spezies-Ebene also ein großes Wirtsspektrum besteht, so ist die Wirtsselektion der vielen Pathotypen hochspezifisch (Gordon und Martyn, 1997; Lievens et al., 2008). Die genetische Basis der Wirtsselektion von *F. oxysporum* ist nur unzureichend geklärt, es scheinen aber sekretierte Proteine involviert zu sein. In *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* wurde ein kleines sekretiertes Cysteinereiches Protein detektiert, welches einerseits Virulenz auf Tomate unterstützt, andererseits vom korrespondierenden R-Gen aus Tomate detektiert werden kann (Rep et al., 2004).

Die Sekretion von Proteinen spielt vor allem in den hemibiotrophen Oomyceten eine Rolle. Oomyceten sind näher mit Braunalgen, Goldalgen und Kieselalgen als mit echten Pilzen verwandt. Die zu den Oomyceten gehörenden *Phytophthora*-Spezies zeigen eine große Varianz in ihrer Wirtsspezifität. Während *P. cinnamomi* über 900 Wirte befallen kann, ist *P. infestans* ein Vertreter mit einem relativ engen Wirtsspektrum. *P. infestans* ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule auf Nachtschattengewächsen. In *P. infestans*, aber auch in vielen anderen Oomyceten sind viele hochpolymorphe Gene bekannt, die mit Virulenz in Verbindung stehen (Kamoun et al., 2006; Birch et al., 2006). Allelische Variationen in diesen Genen, von denen viele für sekretierte Proteine kodieren, resultieren in einer schnellen Anpassung an Wirtsantwortgene und Wirtszelltod während der Infektion und sind typisch für Wirtsspezifitätsfaktoren in biotrophen Pilzen (Allen et al., 2004; Rehmany et al., 2005; Armstrong et al., 2005). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Proteine mit einem RXLR-Motiv die Pflanzenzellmembran überwinden können und in die Pflanzenzelle gelangen (Ellis et al., 2006; Tyler et al., 2009), was wiederum von der Wirtspflanze durch die Produkte von Resistenz- (R)- Genen wahrgenommen werden kann (Allen et al., 2004; Rehmany et al., 2005; Armstrong et al., 2005). Ein Beispiel für ein solches Protein, welches von R-Proteinen wahrgenommen werden kann, ist Avr3c. Der Avirulenz-Lokus *Avr3c* aus *Phytophthora sojae* kodiert für einen „multicopy“-RXLR-Effektor, der sowohl als Avirulenzfaktor als auch als Virulenzfaktor eine Rolle in der Kompatibilität zwischen der jeweiligen *P. sojae*-Rasse und dem Soja-Kultivar spielt (Dong et al., 2009).

Das hemibiotrophe Reispfaden *Magnaporthe oryzae* produziert das Avirulenzgen AVR-Pita, welches in resistenten Reis-Kultivaren von einem putativen cytoplasmatischen Rezeptor Pi-ta detektiert und gebunden wird, woraufhin das pflanzliche Abwehrprogramm gestartet wird (Jia und Martin, 2008). Ein solches Avirulenzgen trägt daher zur Wirtsspezifität auf suszeptiblen Reiskultivaren bei.

Sekretierte Effektoren sind auch aus Rostpilzen bekannt. *Uromyces fabae* ist ein obligat biotropher Rostpilz (Pucciniales) aus der Klasse der Basidiomyceten, der Ackerbohnen befällt. Für *U. fabae* wurde das in Pflanzenzellen translozierte Protein Rtp1 beschrieben, welches eine Rolle in der Etablierung der biotrophen Interaktion spielt und damit auch einen Wirtsspezifitätsfaktor darstellt. AvrM, AvrP4, und AvrP123 aus *Melampsora lini* sind sekretierte Proteine, die Avirulenzfaktoren für Flachs (*Linum usitatissimum*) repräsentieren, da sie eine hypersensitive Antwort mit anschließender Nekrose induzieren können (Catanzariti et al., 2006).

Die Existenz von einer großen Anzahl von Wirtsspezifitätsfaktoren wird auch für die fakultativ biotrophen Brandpilzen *Ustilago maydis*, *Ustilago hordei*, *Sporisorium scitamineum* und *Sporisorium reilianum* als hochwahrscheinlich angenommen. Der erste Avirulenzfaktor, der aus Basidiomyceten kloniert wurde, ist Avr1 aus *U. hordei*, der Wirtsspezifität auf verschiedenen Gerste-Kultivaren kontrolliert (Linning et al., 2004). *U. maydis* ist hochspezialisiert auf Mais (*Zea mays*) und dessen Urform Teosinte und verursacht Maisbeulenbrand. Der nah verwandte Pilz *S. reilianum* *U. hordei* ist ein Gerste (*Hordeum spec.*)-Pathogen und verursacht Hartbrand. Er kann auch Hafer (*Avena spec.*) und Roggen (*Secale spec.*) befallen. *S. scitamineum* befällt Zuckerrohr (*Sacharum officinarum*) und ist der Erreger des Zuckerrohrbrandes. Von *S. reilianum* sind zwei Varietäten bekannt, von denen die eine Maiskopfbbrand verursacht und die andere Hirsekopfbbrand (Halisky, 1963). Von den genannten Brandpilzen ist *U. maydis* der am besten charakterisierte Vertreter. 18% aller Gene, die für sekretierte Proteine kodieren, liegen in 12 Clustern im Genom verteilt vor (Kämper et al., 2006). Individuelle Deletion von fünf von diesen 12 Clustern führte zu einer veränderten Virulenz von *U. maydis* – von völliger Apathogenität bis zu Hypervirulenz (Kämper et al., 2006). Gene, die Avirulenzfaktoren darstellen, könnten auf anderen Maisvarietäten als Virulenzfaktoren wirken, wodurch sie auch in *U. maydis* die Wirtsspezifität kontrollieren würden. Wahrscheinlich sind sehr viele dieser Cluster-Gene in Wirtserkennung sowie –interaktion involviert, was mit der hohen Spezialisierung korreliert. In Clustern angeordnete sekretierte Proteine sind auch im Genom von *S. reilianum* vorhanden (J. Schirawski, pers. Mitteilung).

4.1.5 Die sexuelle Entwicklung der Brandpilze ist eng an die Wirtspflanze gekoppelt

Bis die Brandpilze zur Sporenreife kommen, müssen sie die Pflanzenzellen für ihre biotrophe Ernährungsform am Leben erhalten. Charakteristische Symptome für eine Infektion mit *U. maydis* sind neben Chlorosen an den Blättern sowie einer verstärkten Anthocyanbildung die Ausbildung von Tumoren an allen grünen Pflanzenteilen. In den Tumoren können sich dann die Teliosporen entwickeln. Diese Sporen brechen nach Durchlaufen des Reifungsprozesses auf und setzen die Sporen frei, was ein „verbranntes“ Aussehen der infizierten Pflanze zur Folge hat, von welchem der Name Maisbeulenbrand abgeleitet wurde. Infektionen mit *U. hordei*, *S. scitamineum* und *S. reilianum* verlaufen systemisch und zunächst symptomlos. Die Sporenbildung erfolgt dann ausschließlich in den männlichen und weiblichen Blütenständen, die bei einer Infektion ganz oder teilweise durch die pilzlichen Sori, den Sporenlagern, ersetzt werden (Hanna, 1929; Hu et al., 2002, Piepenbring, 2002).

Brandpilze zeigen wegen ihrer engen Verwandtschaft alle einen sehr ähnlichen Lebenszyklus (Stoll et al., 2005). Der Lebenszyklus von *U. maydis* unterscheidet sich von dem anderer Brandpilze durch die Möglichkeit der Sporenbildung in Tumoren an Blättern, also in der biotrophen Phase, wenn Pilz und Pflanze in sehr engem Kontakt stehen (Abb. 31, rotes Rechteck).

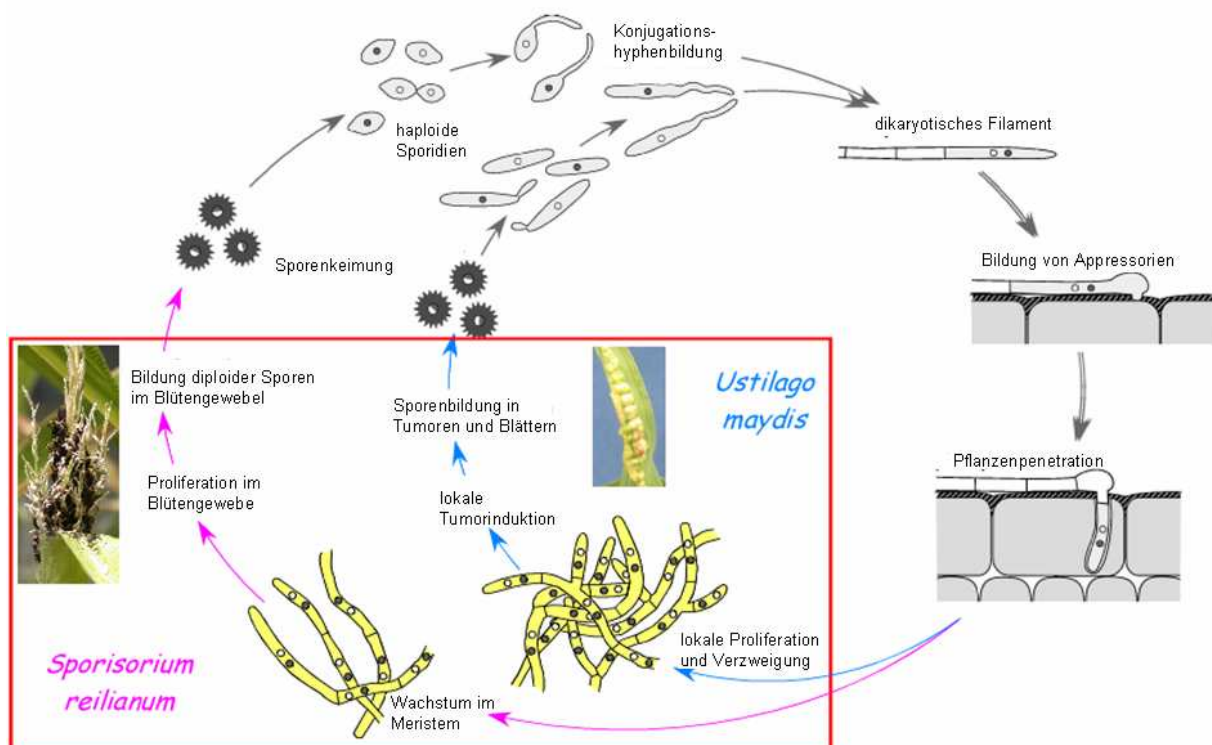


Abb. 31. Lebenszyklus von *S. reilianum* (äußerer Kreis, pink) und von *U. maydis* (innerer Kreis, blau). Der rote Kasten verdeutlicht die Unterschiede der beiden Lebenszyklen während der biotrophen Phase. Abbildung zur Verfügung gestellt von J. Schirawski.

Bis zur Pflanzenpenetration sind die Lebenszyklen der Brandpilze *U. maydis* und *S. reilianum* sehr ähnlich. Die diploiden Teliosporen durchlaufen bei der Keimung eine Meiose und bilden haploide Sporidien unterschiedlicher Paarungstypen, die sich durch Knospung vermehren (Abb. 31). Um die Wirtspflanze besiedeln zu können, müssen zwei Sporidien verschiedener Paarungstypen miteinander paaren. Sporidien unterschiedlicher Paarungstypen stimulieren sich gegenseitig durch die Aussendung und Wahrnehmung sekretierter Pheromone und bilden sogenannte Konjugationshyphen aus (Abb. 31), die an ihren Spitzen zu einem dikaryotischen Filament verschmelzen. Dieser Paarungsprozess wird von den beiden Paarungstyp-Loci *a* und *b* kontrolliert. Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Rezeptor-System, welches für die Zell-Zellerkennung und die Zellfusion verantwortlich ist. Während der *a*-Locus in *U. maydis* biallelisch (*a1* und *a2*) vorliegt, so sind für *S. reilianum* drei *a*-Allele bekannt (*a1*, *a2* und *a3*; Schirawski et al., 2005). Die Pheromone interagieren mit den Pheromonrezeptoren des jeweils anderen *a*-Paarungstyps, wodurch zwei Signalkaskaden induziert werden (Feldbrügge et al., 2004), welche beide in den verschiedenen Phosphorylierungsmustern des Transkriptionsfaktors Prf1 resultieren. Prf1 reguliert entscheidende Gene für die Zellfusion (Kaffarnik et al., 2003) und ist weiterhin dafür verantwortlich, die Transkription der Gene des *b*-Locus einzuleiten. Die Gene des *b*-Locus kodieren für die beiden Homeodomänenproteine bE und bW. Nur bE- und bW-Proteine verschiedener Allele können ein Heterodimer ausbilden, welches als Transkriptionsfaktor für die weitere pathogene Entwicklung benötigt wird (Kämper et al., 1995). Für *U. maydis* ist es sogar gelungen, dieses Wissen zu nutzen, um einen solopathogenen Stamm SG200 herzustellen. Dieser ist mit kompatiblen *a*- und *b*-Loci ausgestattet und kann somit als haploider Stamm pathogen sein (Bölker et al., 1995).

Die nach einer erfolgreichen Paarung gebildeten dikaryotischen filamentösen Hyphen sind in der Lage, die Wirtspflanze penetrieren und zu besiedeln. Dies geschieht mit Hilfe von sog. Appressorien. Appressorien sind spezielle Infektionsstrukturen, die sich an der Pflanzenoberfläche anheften und die Penetration der Pflanze ermöglichen (Abb. 31; Schirawski/Böhnert 2005). Nach Penetration der pflanzlichen Zellwand wachsen *S. reilianum*- und *U. maydis*-Hyphen zunächst intrazellulär in der Pflanzenepidermis, wobei die Cytoplasmamembran der Wirtszelle invaginiert wird und die Pilzhyphe schlauchartig umgibt (Snetselaar und Mims, 1993; Doehlemann et al., 2009). Zwischen der Pilzhyphe und der Cytoplasmamembran der Pflanze entsteht eine apoplastische Zone, die für eine erfolgreiche biotrophe Interaktion eine entscheidende Rolle spielt (Bauer et al., 1997). Bereits 24 Stunden nach der Penetration proliferieren die Hyphen in den Epidermiszellen. Nach der

initialen intrazellulären Kolonisierung der Epidermis dringen die Pilzhypen in das Blattmesophyll und die Leitbündel ein. Während *S. reilianum* wie die meisten anderen Brandpilze entlang der Leitbündel wächst (T. Wollenberg, pers. Mitteilung) und anschließend ins apikale Meristem eindringt (Abb. 31, roter Kasten; Martinez et al., 1999), kann *U. maydis* lokal Tumore zur späteren Sporenbildung induzieren (Abb. 31). Die Tumorbildung geht mit einer Vergrößerung der Pflanzenzellen einher (Kämper et al., 2006; Reineke et al., 2008; Doehlemann et al., 2008b). Ca. 13 Tage nach Infektion unter Laborbedingungen erfolgt die Karyogamie im Tumorgewebe, die Pilzhypen fragmentieren, runden sich ab und differenzieren zu diploiden Teliosporen (Snetselaar und Mims, 1994; Banuett, 1995; Banuett und Herskowitz, 1996; Kahmann et al., 2000). Die diploiden Teliosporen werden im Fall von *U. maydis* ausschließlich in induziertem Tumorgewebe gebildet (Abb. 32A), während *S. reilianum* heranreifendes Blütengewebe zur Bildung der Sporen nutzt (Abb. 32B). Daher dauert es 6-8 Wochen, bis *S. reilianum* seinen Lebenszyklus mit der Bildung von Teliosporen beenden kann.

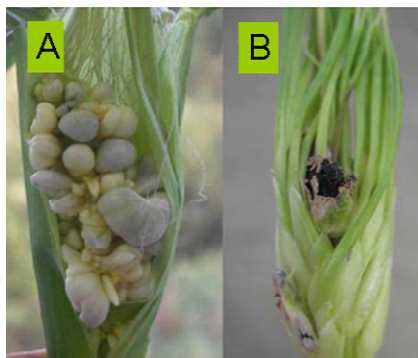


Abb. 32. Symptomatische Unterschiede zwischen *S. reilianum* (SRM)- und *U. maydis*-infizierten Maispflanzen. A. gesunder Kolben. B. *U. maydis* induzierte Tumore. C und D. *S. reilianum* (SRM) verursachte Sporen- und Phyllodiebildung. Abbildung zur Verfügung gestellt von J. Schirawski.

4.1.6 Die beiden *S. reilianum*-Varietäten SRM und SRH als Modellsystem zur Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren in biotrophen Pilzen

Auf Grund der nahen Verwandtschaft und der hochspezialisierten Wirt-Pathogenbeziehung bietet die Gruppe der Brandpilze ein ideales Modellsystem zum Studium und zur Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren in biotrophen Organismen. Die Brandpilze *U. maydis*, *S. reilianum* und *U. hordei* sind molekulargenetisch zugänglich, und das Genom von *U. maydis* ist entschlüsselt. Die Analyse des *U. maydis*-Genoms führte zu der Entdeckung von Genclustern sekretierter Biotrophie-assoziiierter Proteine mit einer Funktion in der Virulenzmodulation (Kämper et al., 2006). Im Laufe dieser Arbeit wurden auch die Genomsequenzen für *S. reilianum* (SRM) und *U. hordei* ermittelt und konnten für die Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren verwendet werden. Darüber hinaus ist seit sehr

kurzer Zeit sogar die Genomsequenz des *S. reilianum*-Hirseisolats (SRH) verfügbar. Damit stehen nun zwei Genome von zwei Varietäten einer Art zur Verfügung, deren Unterschiede hauptsächlich in Genen liegen sollten, die für Wirtsspezifität verantwortlich sind.

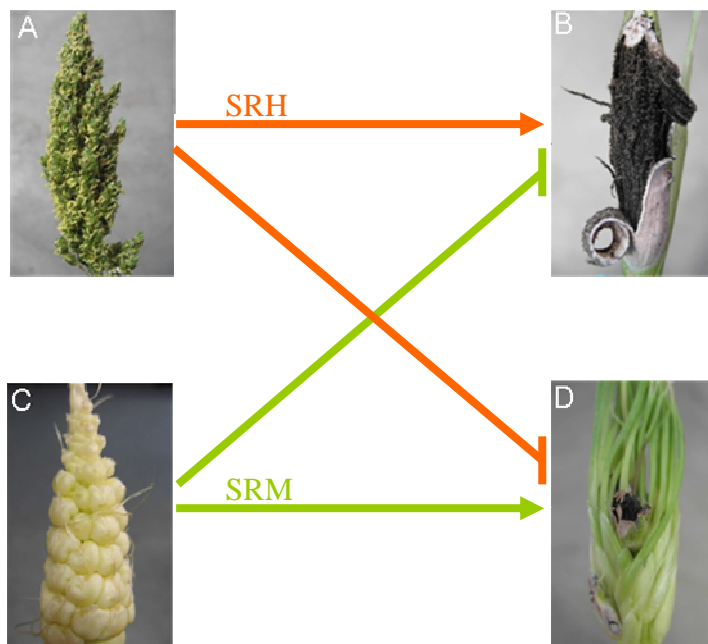


Abb. 33. *S. reilianum*-Varietäten SRH und SRM sind spezifisch für Hirse bzw. Mais. Gesunder Hirse-Blütenstand (A), durch einen Pilzsorus ersetzter Blütenstand von Hirse (B), gesunder Maiskolben (C), Sporen und Phyllodie im Maisblütenstand. (Abbildung nach J. Schirawski).

Während SRH spezifisch für Sporenbildung auf Hirse ist, so ist SRM spezifisch für Sporenbildung auf Mais (Abb. 33). Dennoch können Paarungstyp-kompatible Stämme der beiden Varietäten miteinander paaren (J. Schirawski, pers. Mitteilung). Dieses Vermögen stellt einen weiteren Vorteil für die Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren dar. Eine solche Intervarietätenkreuzung hatte eine dramatisch verminderte Virulenz sowohl auf Mais als auch auf Hirse zur Folge. Dies spricht dafür, dass einige Effektoren von der jeweiligen Nichtwirtspflanze erkannt und dadurch die Virulenz abgemildert werden könnte. Es ist auch möglich, dass durch diese Kreuzung wirtsspezifische Genprodukte fehlten oder nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung standen, um Virulenz zu vermitteln.

Darüber hinaus lassen sich die beiden *S. reilianum*-Varietäten ebenso wie der gut studierte verwandte Pilz *U. maydis* in seiner haploiden, hefeähnlichen Form leicht auf Fest- oder in Flüssigmedium kultivieren. Auch alle für *U. maydis* gängigen genetischen und molekularbiologischen Methoden können für *S. reilianum* benutzt werden (Schirawski et al., 2005). Insbesondere ist es mit Hilfe von für *S. reilianum* optimierten Plasmiden möglich, Fremd-DNA in einen definierten Integrationsort, den Cbx-Locus, einzubringen.

Ziele der Arbeit

1. Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren aus *S. reilianum* SRM mittels Genomvergleich von *S. reilianum* SRM und *S. reilianum* SRH, die möglicherweise Virulenz auf Mais begünstigen und auf Hirse schwächen könnten.
2. Experimentelle Validierung der Beteiligung der Kandidatengene an der Wirtswahl.

5 Ergebnisse Teil 2

5.1 Mikroskopischer Vergleich der Infektion von Hirse mit dem *S. reilianum* Hirseisolat und dem *S. reilianum* Maisisolat

Um zu untersuchen, ob es bei der Infektion von Hirse mit dem *S. reilianum*-Hirseisolat (SRH) und der Infektion mit dem *S. reilianum*-Maisisolat (SRM) mikroskopische Unterschiede gibt, wurden verschiedene Abschnitte des dritten Blattes 15 Tage nach der Infektion mikroskopiert und der Weg des Pilzes in der Pflanze verfolgt. Das infizierte Pflanzenmaterial wurde mit dem Farbstoff Chlorazol-Black-E angefärbt, um die Pilzhyphen innerhalb des Gewebes sichtbar zu machen.

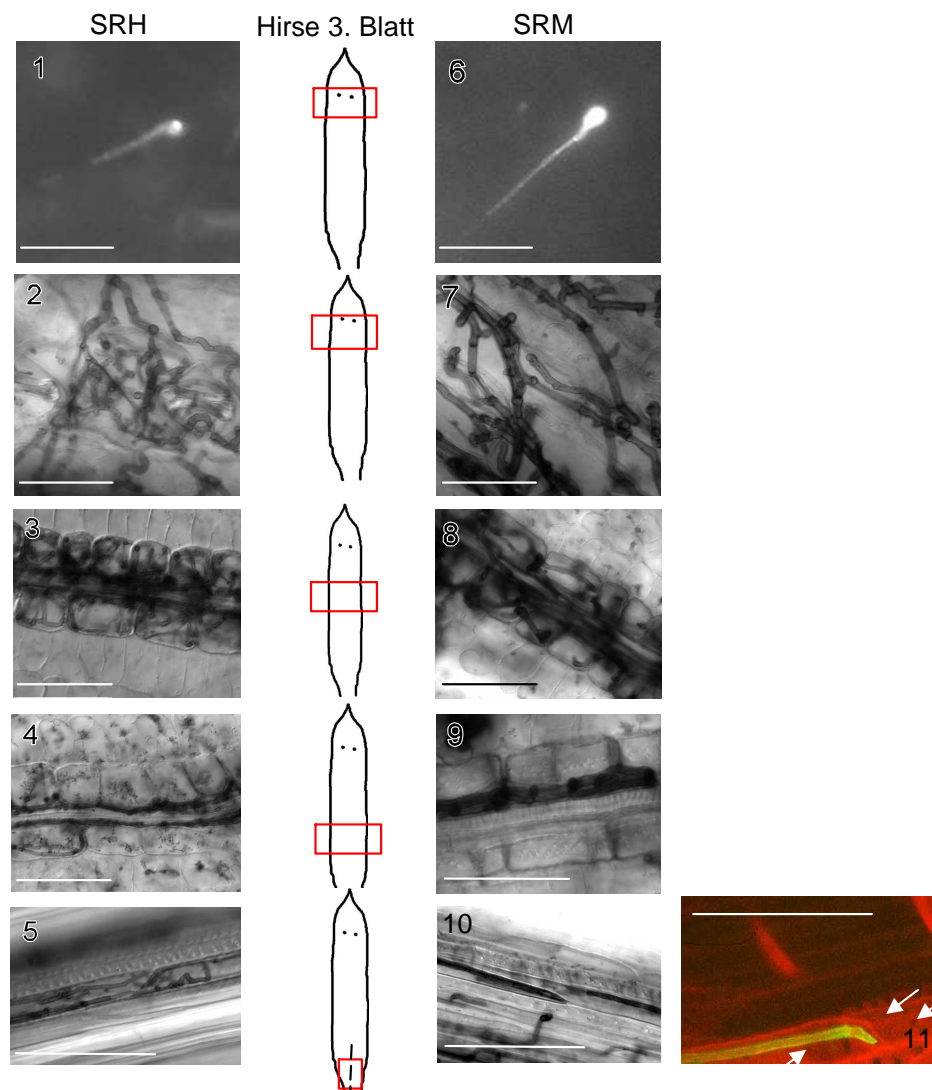


Abb. 34. Mikroskopischer Vergleich von mit SRH (1-5) und SRM (6-11) infizierten Hirseblättern. Es wurde jeweils das dritte Blatt zur Mikroskopie mit Calcofluor (1, 6), Chlorazol-Black-E (2-5, 7-10) oder mit WGA-Alexafluor-Propidiumiodid (11) angefärbt. Die Skizzen in der zweiten Spalte geben die ungefähren Positionen (roter Kasten) der Mikroskopieaufnahmen an. Das Hauptleitbündel ist durch eine

gestrichelte Linie im untersten Bild symbolisiert. Während SRH und SRM keine Unterschiede in der Appressorienbildung (1, 5) aufwiesen und auch beide in der Epidermis (2, 7) und in den Leitbündelscheidezellen (3, 8) proliferierten, wurden im Innern der Leitbündel (4, 9) und in den Geleitzellen des Phloems (5, 10) weniger SRM-Hyphen als SRH-Hyphen beobachtet (quantitativer Effekt nicht dargestellt). Die Bilder (5, 10) zeigen Ausschnitte aus dem Hauptleitbündel. In dem „Z-Stack“ der mit WGA-Alexafluor/Propidiumiodid angefärbten Probe (11) sind die Poren sichtbar, die die Geleitzellen mit den Phloemzellen verbinden (Pfeile). Ein Unterschied zwischen SRH- und SRM-Hyphen könnte darin bestehen, dass sich die SRM-Hyphen im Gegensatz zu den SRH-Hyphen innerhalb der Geleitzellen nicht proliferieren können, da im Fall der SRM-Infektion ausschließlich einzelne Hyphen beobachtet wurden. Der Maßstab entspricht jeweils einer Länge von 50 µm.

Die mikroskopische Analyse der infizierten Hirseblätter ergab, dass beide Stämme Appressorien ausbildeten (Abb. 34, Bilder 1 und 6). Weiterhin proliferierten beide Stämme im Bereich bis 3 cm unterhalb des Einstichlochs in der Epidermis (Abb. 34, Bilder 2 und 7). Beide Isolate drangen in die Leitbündelscheidezellen ein (Abb. 34, Bilder 3 und 8), wobei sie sich wahrscheinlich von der dort vorliegenden Stärke ernährten. Jedoch war SRM etwas seltener innerhalb der Leitbündelscheidezellen zu beobachten. Von den Leitbündelscheidezellen aus gelangten die SRH- und die SRM-Hyphen in das Innere des Leitbündels (Abb. 34, Bilder 4 und 9). Die von den Hyphen kolonisierten Leitbündelzellen wiesen eine für Geleitzellen des Phloems typische trapezartige Form auf (Abb. 34, Bilder 5, 10 und 11). Während die Geleitzellen des Phloems mit mehreren Hyphen des Hirseisolats angefüllt waren (Abb. 34, Bild 5), so waren Hyphen des Maisisolats nur sehr selten in den Geleitzellen zu detektieren (Abb. 34, Bild 10) und schienen sich nicht in ihnen vermehren zu können.

Es könnte sein, dass Proliferation der Pilzhypen innerhalb der Phloem-Geleitzellen wichtig für eine erfolgreiche Kolonisierung der Wirtspflanze ist und dass das Maisisolat wegen seiner scheinbaren Unfähigkeit in Phloem-Geleitzellen zu proliferieren, auf Hirse nicht zur Sporenbildung kommt.

5.2 Analysen zur Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren für Mais in *Sporisorium reilianum*

Um Wirtsspezifitätsfaktoren zu identifizieren, die *S. reilianum* SRM die Infektion von Mais erlauben, die Infektion von Hirse aber verhindern, wurde mittels Genomvergleich nach Genen gesucht, die in den Maispathogenen SRM und *U. maydis* vorhanden und in den eng verwandten Pathogenen anderer Wirte (*S. reilianum* SRH und *Ustilago hordei*) abwesend sind.

Dazu wurde zunächst über Genomvergleich nach Genen gesucht, die sowohl in *U. maydis* als auch in *S. reilianum* SRM vorkommen. Das waren 6421 Gene. Von diesen 6421 Genen wurden über Genomvergleich mit *U. hordei* nur 83 als Kandidaten für

Wirtsspezifitätsfaktoren identifiziert, die im Genom von *U. hordei* abwesend waren. Diese 83 Gene wurden in Zusammenarbeit mit S. Poppe über heterologe PCR auf Abwesenheit in den *S. reilianum* SRH-Stämmen H2-7 und H2-8 getestet. Von den 83 getesteten Genen konnten neun nicht in SRH H2-7 und H2-8 über PCR amplifiziert werden. Diese restlichen neun Kandidaten wurden mittels Southern-Hybridisierung auf ihre An- oder Abwesenheit in den SRH-Stämmen H2-7 und H2-8 überprüft. Dabei konnten vier Gene identifiziert werden, welche in den Genomsequenzen der Maispathogene *U. maydis* und *S. reilianum* Maisisolat 5-1 vorkommen, in der von *U. hordei* und in den *S. reilianum*-Hirseisolat-Stämmen H2-7 und H2-8 jedoch fehlen. Die vier Kandidaten waren *sr10807*, *sr13864*, *sr16560* und *sr15976*. Diese Arbeiten sind in der Bachelor-Arbeit von S. Poppe dokumentiert. Per RT-PCR wurde im Folgenden untersucht, ob die Gene in SRM während der biotrophen Phase exprimiert werden. Dafür wurde RNA aus axenischer Kultur und aus mit den SRM-Stämmen 5-1x5-2 infizierten Maisproben der Varietät Gaspe Flint aus den Geweben Nodium und Blüte isoliert, mit DNase behandelt, in cDNA umgeschrieben, und diese als Matrize für PCR verwendet.



Abb. 35. RT-PCR an cDNA aus *S. reilianum* (Maisisolat, SRM) in axenischer Kultur und aus SRM infiziertem Pflanzenmaterial (22 Tage nach Infektion). Für die Amplifikation der Ziel-cDNA wurden jeweils forward- und revers-Primer eingesetzt, die sich spezifisch innerhalb der offenen Leserahmen von *sr10807*, *sr13864*, *sr16560*, *sr15976* und *sr15912* anlagerten. *sr15912* kodiert für ein ribosomales Protein und wurde als Haushaltsgen eingesetzt, um die Integrität der cDNA überprüfen und um Mengenverhältnisse der Transkripte abschätzen zu können. Als Größenstandard (links und rechts) diente die 2-Log-Leiter (Fermentas).

Die Analyse der Genexpression mittels RT-PCR ergab, dass das Kandidatengen *sr10807* nur in RNA aus axenischer Kultur, nicht aber in den aus infiziertem Pflanzenmaterial gewonnenen Proben nachweisbar war. Dies könnte darauf hindeuten, dass Transkription von *sr10807* in der Pflanze herunterreguliert wird. Eine negative Regulation wurde auch für *um02219*, dem Homolog von *sr10807* beobachtet. MicroArray-Daten mit *U. maydis* infiziertem Tumorgewebe in Vergleich zu axenischer Kultur zeigten, dass *um02219* während der biotrophen Phase ausgeschaltet ist (M. Vranes, persönliche Mitteilung).

Das Gen *sr13864* hingegen schien in den beiden untersuchten Geweben Nodium und Blüte exprimiert zu werden. Auch die mRNA der beiden weiteren Kandidaten *sr16560* und *sr15796* wurde während der biotrophen Phase gebildet und konnte per RT-PCR detektiert werden, wobei *sr16560*-mRNA sowohl in den Proben aus Nodium als auch aus der Blüte detektiert werden konnte, während *sr15796*-mRNA nur in RNA aus Nodium detektiert wurde. Damit ergaben sich drei Gene, *sr13864*, *sr16560* und *sr15796* als während der biotrophen Phase exprimierten Kandidaten für mögliche Wirtsspezifitätsfaktoren.

5.3 Vergleich der Genomsequenzen der *S. reilianum*-Stämme 5-1 (Maisisolat) und H2-8 (Hirseisolat)

Seit Januar 2009 stehen neben den Genomsequenzen von *U. maydis*, *S. reilianum* SRM und *U. hordei* zwei weitere Genomsequenzen aus der Klasse der Ustilaginomyceten zu Verfügung: die Sequenz des *S. reilianum* Hirseisolat-Stamms H2-8 und des Zuckerrohr infizierenden *S. scitamineum*-Stamms, I1. Um zu überprüfen, ob die in Kapitel 5.3 mittels des beschriebenen Genomvergleichs ausgewählten Kandidatengene tatsächlich im Genom von SRH sowie darüber hinaus auch in *S. scitamineum* abwesend sind, wurden neue Genomvergleiche durchgeführt. Zunächst wurde mittels BLASTX-Analyse untersucht, welche der in dem SRM-Stamm 5-1 annotierten Gene im Genom des SRH-Stamms H2-8 vorkommen. Von den 6650 in *S. reilianum* 5-1 annotierten Genen zeigten 6090 (92%) eine Sequenzidentität von >70%.

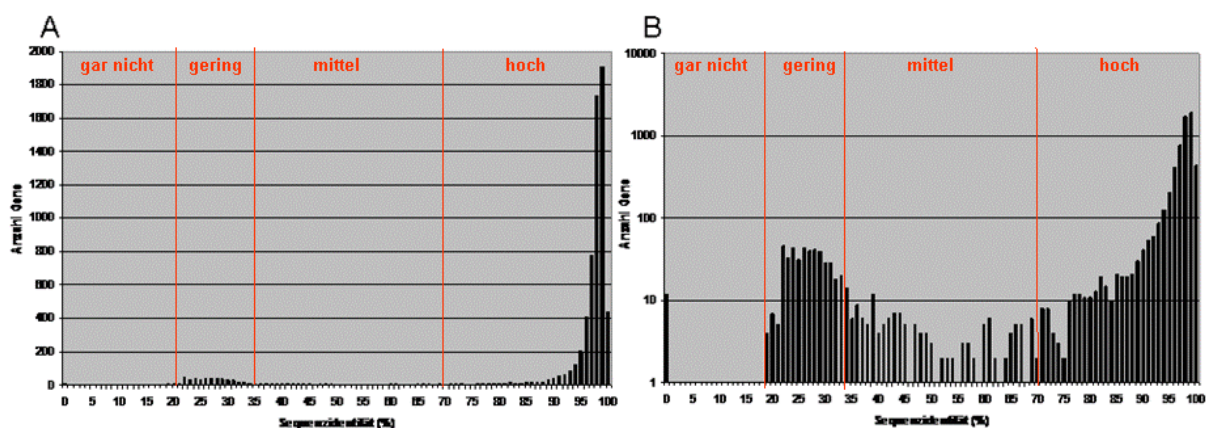


Abb. 36. Histogramm zur Verteilung der 6650 annotierten SRM-Gene, die eine ähnliche AS-Sequenzidentität zum Genom des SRH-Stamms mittels BLASTX-Analyse aufweisen. (Die drei Paarungstyp-spezifischen Gene *Lga2*, *Rga2* und *mfa2.1* wurden aus dem Histogramm ausgeschlossen.) Das Histogramm ist in 1%-Intervalle unterteilt. Solchen Proteinen, die einen e-Wert >10⁻⁵ aufweisen, wurde eine Sequenzidentität =“0“ zugewiesen. A. Lineare Darstellung der „Anzahl Gene“ pro 1%-Sequenzidentitätsintervall. B. Die Anzahl der Gene pro 1%-Intervall wurde logarithmiert, um eine bessere Auflösung im kleineren Bereich zu erzielen. „gar nicht“, „gering“, „mittel“ und „hoch“ beschreiben die Art der Konservierung.

Nur 228 (3,4%) der Gene waren mittelmäßig konserviert mit einer Sequenzidentität von 30-70%. 321 Gene (4,8%) zeigten in diesem Vergleich eine Sequenzidentität >30%. Innerhalb dieser schwach konservierten Gene zeigten 15 (0,2%) eine Sequenzidentität <19% (Tabelle 1). Unter diesen 15 in *S. reilianum* 5-1 annotierten Genen, die im Genom von *S. reilianum* H2-8 scheinbar fehlen, sind drei mit dem a2-Paarungstyp assoziierte Gene (Tabelle 1, *sr16902* (*lga2*), *sr16903* (*rga2*) und *sr16904* (*mfa2.1*)), die durch den unterschiedlichen a-Paarungstyp der untersuchten Stämme auftreten und deshalb als Kandidaten für Wirtsspezifität ausgeschlossen wurden. Für neun der verbleibenden zwölf in *S. reilianum* 5-1 annotierten Gene ohne Homologe in *S. reilianum* H2-8 konnte auch im Genom von *U. maydis* kein Homolog (>19% Sequenzidentität) identifiziert werden (Tabelle 1). Von den verbleibenden drei Genen besitzt eins, *sr12494*, sowohl ein Homolog im Genom des Gerstenpathogens *U. hordei* (e-Wert: $1.2e^{-130}$) und ein Homolog im Zuckerrohrpathogen *S. scitamineum* (e-Wert: $6.6e^{-161}$) und eins, *sr15796*, ein Homolog im Genom des Zuckerrohrpathogens *S. scitamineum* (e-Wert: $3.7e^{-104}$, Tabelle 1). Nach dieser Analyse gibt es nur ein Gen aus dem Maispathogen *S. reilianum* 5-1 (*sr13864*), das ein Homolog im verwandten Maispathogen *U. maydis* besitzt (*um00823*), aber in den bisher sequenzierten Pathogenen anderer Wirtspflanzen aus der Klasse der Ustilaginomyceten (*U. hordei*, *S. scitamineum* und SRH) nicht vorkommt.

Tabelle 1: BLAST-X-Analyse der Gene aus SRM, die in SRH abwesend sind (<19% Sequenzidentität) mit den Genomsequenzen von *U. maydis*, *S. scitamineum* und *U. hordei* (Nur BLAST-Hits mit einem e-Wert<0,001 wurden berücksichtigt)

<i>S. reilianum</i> -Gen	Annotation	Bester BLAST-Hit aus <i>U. maydis</i>	Bester BLAST-Hit aus <i>S. scitamineum</i> (e-Wert)	Bester BLAST-Hit aus <i>U. hordei</i> (e-Wert)
sr12494	konserviert hypothetisches Protein	um01428	6.6e-161	1.2e-130
sr13864	konserviert hypothetisches Protein	um00823		
sr15796	konserviert hypothetisches Protein	um10501	3.7e-104	
sr10062	hypothetisches Protein	um00440		
sr10064	Ähnlichkeit zu Retrovirus-ähnlichem POL Polyprotein	um06265	0.	6.5e-38
sr13863	konserviert hypothetisches Protein	um02374	2.1e-182	
sr15797	hypothetisches Protein	um04119	1.7e-08	
sr12116	hypothetisches Protein	um05261		8.1e-05
sr16602	konserviert hypothetisches Protein	um01961		0.00017
sr13247	konserviert hypothetisches Protein	um02499	2.3e-193	
sr15069	konserviert hypothetisches Protein	um03537		
sr16902	Lga2	0	4.9e-26	
sr16903	Rga2	0	3.2e-56	
sr16904	Paarungsfaktor a2.1	0	3.8e-10	

Dieses Gen (*sr13864*) bzw. sein Homolog aus *U. maydis* (*um00823*) kommt daher als Kandidat für einen Wirtsspezifitätsfaktor mit evtl. dualer Funktion als Virulenzfaktor für Mais und Avirulenzfaktor für andere Wirtspflanzen (z. B. Hirse) in Frage.

5.3.1 Vergleich der Aminosäure- und DNA-Sequenzen von um00823 und sr13864

Durch Vergleich der Genomsequenzen von *U. maydis*, *U. hordei*, SRM, SRH und *S. scitamineum* konnte ein Gen identifiziert werden, das nur in den beiden Maispathogenen *U. maydis* und SRM vorkommt und damit als Kandidat für einen Wirtsspezifitätsfaktor mit Virulenzfunktion für Mais und Avirulenzfunktion für andere Wirte in Frage kommt.

Während die abgeleitete Aminosäure- (AS)- Sequenz von *um00823* eine N-terminale Signalsequenz für Sekretion besitzt (SIGNAL-P; Nielsen, 1997; Bendtsen, 2004; Abb. 37A), so gilt dies nicht für die von *sr13864* abgeleitete AS-Sequenz. Die abgeleitete AS-Sequenz von *sr13864* ist 81 AS kürzer als sein Homolog aus *U. maydis*.

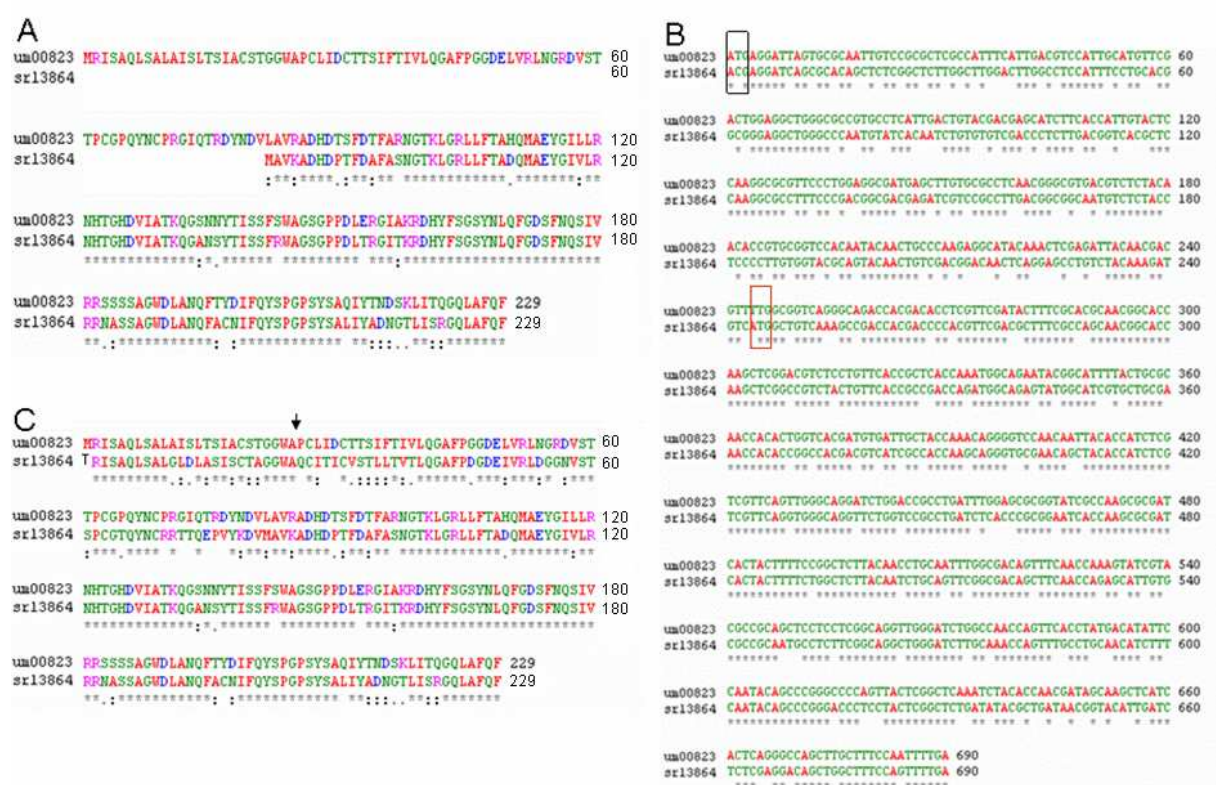


Abb. 37. ClustalW- Alignments der Aminosäure (AS)- und Nukleotid (NT)- Sequenzen von um00823 und sr13864 bzw. *um00823* und *sr13864*. A. Alignment von um00823 (MUMDB) und sr13864 (MSRDB, unveröffentlicht). Die AS-Sequenz von sr13864 startet in Relation zu um00823 an AS-Position 82. B. Alignment von *um00823* und *sr13864*. Die DNA-Sequenz stromaufwärts des *sr13864*-ATG-Startcodons (roter Kasten) ist zum Vergleich mit angegeben. An der Position des *um00823*-ATG-Startcodons im Genom von *S. reilianum* befindet sich ein ACG-Codon (schwarzer Kasten). C. Alignment der AS-Sequenzen von *um00823* mit der zum Vergleich angegebenen, putativen AS-Sequenz von sr13864. Das Signalpeptid ist konserviert, so dass mittels SIGNAL-P dieselbe Schnittstelle (Pfeil) berechnet wird. Die Konsensusymbole unterhalb der Vergleiche bezeichnen im Fall des Nukleotidvergleichs identische (*) Nukleotide (B) und im Fall des Aminosäurevergleichs identische (*), ähnliche (:), geringfügig ähnliche (.) und unterschiedliche Aminosäurereste (A und C).

Ein Vergleich der stromaufwärts des *sr13864*-ATG-Startcodons befindlichen Nukleotid (NT)-Sequenz von *sr13864* mit der NT-Sequenz von *um00823* ergab, dass auch der Bereich stromaufwärts des *sr13864*-ATG-Startcodons mit 64% NT-Identität konserviert ist (Abb.

37B). Der Grund für die derzeitige Annotation des *sr13864*-ORFs liegt darin, dass an analoger Stelle der Position des ATG-Startcodons von *um00823* in *sr13864* ein ACG-Codon vorliegt. Auf Grund der ansonsten hohen Konservierung wurde zunächst überprüft, ob evtl. auf genomischer Ebene ein Sequenzierfehler vorliegt. Dies konnte mittels Sequenzierung eines das ACG-Codon enthaltenden PCR-Produkts widerlegt werden (nicht dargestellt). Als nächstes wurde geprüft, ob auf mRNA-Ebene C->U-Editierung stattfindet, was in einem normalen AUG-Translationsstart resultieren würde. Dafür wurde cDNA per PCR mit Primern amplifiziert, die die Zielsequenz flankieren. Auch die amplifizierte cDNA wurde sequenziert und zeigte an dieser Position ein ACG (nicht dargestellt). Damit konnte auch C->U-Editierung ausgeschlossen werden.

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass auch ein ACG als Startcodon fungieren kann, wenn sich dieses Codon in einem günstigen Sequenzkontext, der sog. Kozak-Sequenz (Kozak, 1984) befindet (Abb. 38; Tang et al., 2004; Huang et al., 2006; Chen et al., 2009). Die Kozak-Sequenz lässt Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit zu, mit der das vorliegende ATG oder das vorliegende alternative Startcodon als Startcodon Verwendung findet. Eine Analyse der das Startcodon direkt umgebenden Sequenz sollte ermitteln, ob der Sequenz-Kontext eine Nutzung des ACGs als Startcodon wahrscheinlich macht. Dabei wurde der Sequenzkontext des putativen ACG-Startcodons von *sr13864* mit den Kozak-Sequenzen von *S. cerevisiae* (Hamilton et al., 1987) und von Vertebraten (Kozak, 1984) verglichen (Abb. 38). Zusätzlich wurde auch die Sequenzumgebung des Startcodons der Alanyl-tRNA-Synthetase aus *S. cerevisiae* mit eingeschlossen, für die die Nutzung eines ACG-Startcodons nachgewiesen wurde (Abb. 38; Huang et al., 2006).

	-7	-3	+1
S.c.-Kozak-Sequenz:	C	A	A
<i>um00823</i> :	C	A	A
<i>sr13864</i> :	C	A	A
<i>S.c. ala1</i> :	C	A	A
Vertebraten-Kozak-Sequenz:	C	A	A

Abb. 38. Vergleich der Sequenzumgebungen der putativen Startcodons von *um00823* und *sr13864* mit der Alanyl-tRNA-Synthetase (*ala1*) aus *S. cerevisiae* (S.c.) sowie mit den Kozak-Sequenzen von *S. cerevisiae* (S. c) und Vertebraten. Konservierte Positionen sind fett dargestellt. R=A/G.

Für die Kozak-Sequenz aus *S. cerevisiae* wurde ein A an der Nukleotidposition -3 als besonders wichtig identifiziert. Auch ein A an Position +4 erhöht die Wahrscheinlichkeit der Nutzung als Startcodon (Chen et al., 2009). Außerdem wurde in einer Analyse, die nur Säugergene umfasste, festgestellt, dass einem C an Position -7 eine wichtige Bedeutung zukommt, wenn es um die Verwendung von alternativen Translationsstarts geht (Wegrzyn et

al., 2007). Die Sequenzumgebung des putativen ACG-Startcodons von *sr13864* zeigt, wie die von um00823, die von der Kozaksequenz geforderte Konservierung eines A an Position -3 und darüber hinaus einem C an Position -7 (Abb. 38). Auch das A an Position +4 erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der ORF für *sr13864* mit einem ACG-Startcodon beginnt und für ein Protein von 229 AS kodiert, das eine AS-Sequenzidentität von 74% zu um00823 aufweist. Sogar 85% der AS sind in ihrer Eigenschaft konserviert. Weiterhin ergab eine Signal-P-Analyse, dass auch das Signalpeptid in *sr13864* konserviert ist, wobei eine putative Schnittstelle berechnet wurde, die sich im Vergleich zu um00823 an der identischen Position befand (s. Pfeil, Abb. 37).

Die vorliegende bioinformatische Analyse deutet darauf hin, dass *sr13864* mit Signalpeptid exprimiert wird. Um zu überprüfen, ob *sr13864* für ein sekretiertes Protein kodiert, könnte das Gen mit Hilfe eines konstitutiven Promoters und eines geeigneten Tags exprimiert und im Überstand detektiert werden. Mittels MALDI-TOF könnte die Aminosäuresequenz bestimmt werden.

5.3.2 Deletion von *um00823* in *U. maydis* führt zu einer Virulenzreduktion

Um zu überprüfen, ob das identifizierte Kandidatengen *um00823* für die Infektion von Mais wichtig ist, wurden in Zusammenarbeit mit S. Poppe Deletionsmutanten hergestellt, in denen das Gen *um00823* durch eine Hygromycinresistenzkassette ersetzt wurde.

Es wurden insgesamt fünf unabhängige SG200Δ*um00823*-Deletionsstämme hergestellt, die eine Virulenzreduktion zwischen 11% und 64% im Vergleich zum SG200-Parentalstamm aufwiesen. Der Deletionsstamm SG200Δ*um00823*#9 zeigte eine ca. 40%ige Reduktion der Viulenz (Abb. 39). Um zu zeigen, dass dieser Effekt allein auf das Fehlen von *um00823* zurückzuführen ist, wurde das Gen *um00823* mit Promoter (2 kb) und dem nos-Terminator in den Cbx-Lokus des Stammes SG200Δ*um00823*#9 integriert. Zwei positive Transformanten (SG200Δ*um00823*#9+*um00823*#1 und SG200Δ*um00823*#9+*um00823*#5), die Ausgangsstämme SG200 und SG200Δ*um00823*#9 und die Stämme SG200Δ*um00823*#1,#14,#6 und #16 wurden zunächst auf Filamentbildung auf PD-Charcoal-Agar überprüft, um einen Defekt in der Filamentbildung auszuschließen, die für eine erfolgreiche Penetration notwendig ist (Abb. 39A). Alle in diesem Experiment eingesetzten Stämme zeigten Filamentbildung auf PD-Charcoal-Agar, was bedeutet, dass auch die Mutanten im Vergleich zum solopathogenen Ausgangsstamm in der Aktivität der Pheromon-abhängigen Signalkaskaden nicht beeinträchtigt sind und die für die Pathogenität wichtigen b-Gene durch den Transkriptionsfaktor Prf1 aktiviert sind. Alle Stämme wurden in einem

Infektionsexperiment getestet. Die beiden Komplementationstämme SG200 Δ um00823#9+um00823#1 und SG200 Δ um00823#9+um00823#5 zeigten eine dem SG200-Ausgangsstamm vergleichbare Tumorrates, die 1,8mal so hoch war wie die des SG200 Δ um00823#9-Stammes (Abb. 39B). Die Pheromone interagieren mit den Pheromonrezeptoren des jeweils anderen a-Paarungstyps, wodurch zwei Signalkaskaden induziert werden (Feldbrügge et al., 2004), welche beide in den verschiedenen Phosphorylierungsmustern des Transkriptionsfaktors Prf1 resultieren. Prf1 reguliert entscheidende Gene für die Zellfusion (Kaffarnik et al., 2003) und ist weiterhin dafür verantwortlich, die Transkription der Gene des b-Locus einzuleiten.

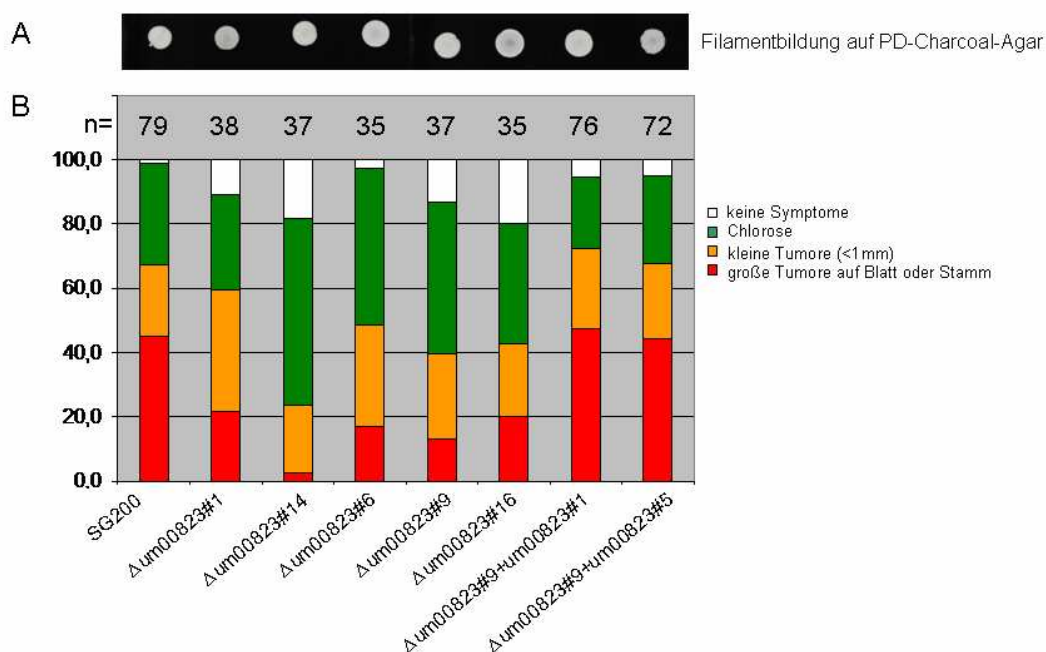


Abb. 39. Virulenztest. A. Test auf Filamentbildung auf PD-Charcoal-Agar, Stämme wie in B. B. Virulenztest 7 Tage nach Infektion der Maisvarietät Early Golden Bantam. Jede Pflanze wurde in eine von vier Kategorien nach dem stärksten sichtbaren Symptom eingeteilt: Große Tumore auf Blatt und Stamm (rot), kleine Tumore (<1 mm) (orange), Chlorose (grün), keine Symptome (weiß).

Dieses Experiment zeigt, dass es sich bei um00823 aus *U. maydis* um einen Virulenzfaktor für die Infektion von Mais handelt.

5.3.3 *Sr13864* kann den Virulenzdefekt der SG200 Δ um00823#9-Mutante teilweise aufheben

Um herauszufinden, ob *sr13864* die Funktion von *um00823* ersetzen kann, wurde getestet, ob die Integration von *sr13864* mit seinem nativen Promoter in den Cbx-Lokus von SG200 Δ um00823#9 den Phänotyp der reduzierten Virulenz komplementieren kann. Dafür wurde *sr13864* mit nativer Promoterregion (2,9 Kb) in die Nde1- und Not1-Schnittstellen des

Plasmids p123 (C. Aichinger) kloniert. Zur Integration in den Cbx-Locus von *U. maydis*-SG200 Δ um00823#9 wurde das generierte Plasmid mit Age1 linearisiert.

Nur eine der durch Southern Blot getesteten Transformanten zeigte das erwünschte Muster einer einfachen Insertion in den Cbx-Locus. Eine weitere Transformante zeigte ein Muster, welches auf eine doppelte Integration in den Cbx-Locus hindeutete. Mit diesen beiden Stämmen, SG200 Δ um00823#9+sr13864#3 und SG200 Δ um00823#9+(2x sr13864)#2, den beiden Deletionsstämmen SG200 Δ um00823#9 und SG200 Δ um00823#16, dem Komplementationsstamm SG200 Δ um00823#9+um00823#5 und dem SG200 Wildtyp-Stamm wurden 7 Tage alte Maispflanzen der Varietät Early Golden Bantam infiziert und nach 7 Tagen auf Tumorbildung untersucht.

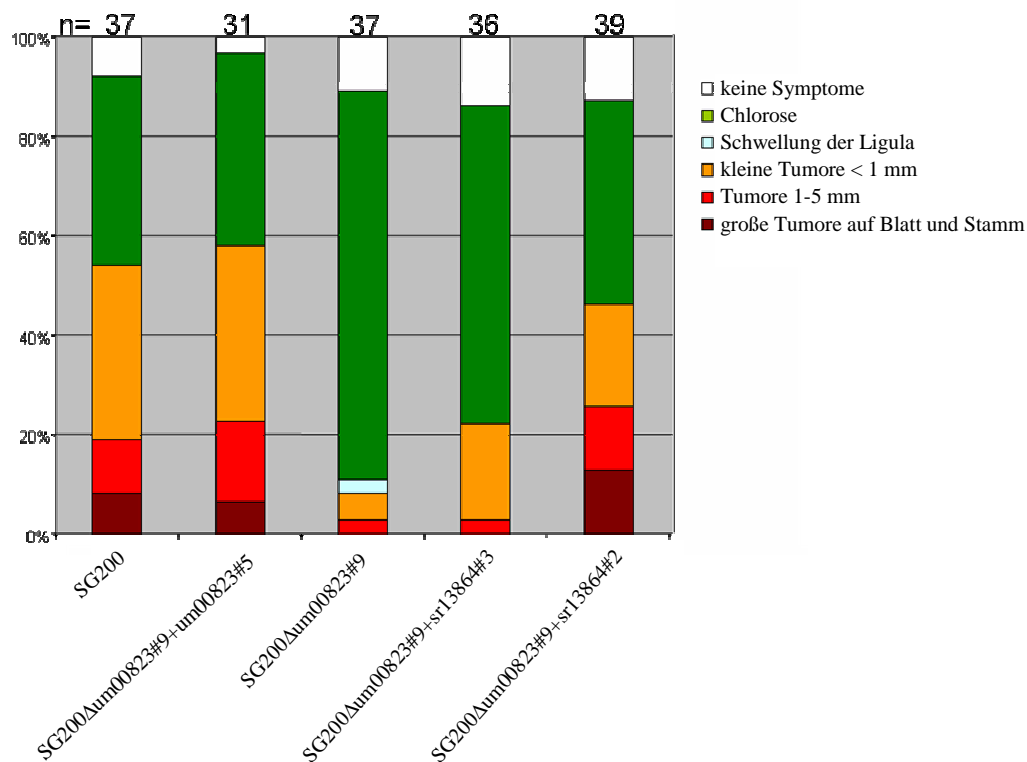


Abb. 40. Virulenztest. Virulenztest 7 Tage nach Infektion der Maisvarietät Early Golden Bantam mit *U. maydis*-Stämmen. Jede Pflanze wurde nach dem stärksten Symptom in eine von sechs Kategorien eingeteilt: große Tumore auf Blatt oder Stamm (dunkelrot), Tumore 1-5 mm (rot), kleine Tumore (<1mm), Schwellung der Ligula (hellblau), Chlorose (grün), keine Symptome (weiß). Dieses Experiment stellt eines von zwei Experimenten mit ähnlichem Ergebnis dar.

Der Stamm SG200 Δ um00823#9+um00823#5 zeigte eine dem SG200-Ausgangsstamm vergleichbare Tumorraten von knapp 60% (Abb. 40). Hingegen war der SG200 Δ um00823#9-Stamm dramatisch um 80% in der Tumorraten reduziert (Abb. 40). Der SG200 Δ um00823#9+sr13864#3-Stamm mit einer einfachen Integration des Gens für sr13864 zeigte eine Tumorraten von nur 20%, was einer 40%igen Reduktion in der Tumorraten im

Vergleich zum SG200-Ausgangsstamm gleichkam, aber einer Verdopplung im Vergleich zu SG200Δum00823#9 (Abb. 40). Damit kann dieser Stamm den Defekt in der Tumorrates nicht oder nur teilweise komplementieren. Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm SG200Δum00823#9+(2x sr13864)#2 mit der doppelten Integration des Gens *sr13864* eine Tumorrates von 46%, was einer nur 20%igen Tumorreduktion und einer Vervierfachung im Vergleich zum SG200-Ausgangsstamm entspricht. Dies deutet darauf hin, dass *sr13864* in höherer Kopienzahl in der Lage ist, den Virulenzdefekt von Δum00823 ganz oder teilweise zu komplementieren. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass *sr13864* eine ähnliche Funktion wie *um00823* erfüllt. Vielleicht wird in *U. maydis* eine höhere Gendosis an *sr13864* benötigt, damit ein Effekt auf die Virulenz sichtbar wird oder der *sr13864* –Promoter wird nicht so stark exprimiert wie in *S. reilianum*. Dazu müsste in einem Northern-Blot-Experiment oder über Real-Time-PCR die Menge an gebildeter *sr13864*-mRNA gemessen werden. *sr13864* könnte in den nativen Locus hinter den um00823-Promoter inseriert werden. Nichtsdestotrotz könnten auch noch weitere Stämme generiert werden, die sowohl einfache als auch mehrfache Insertionen des Gens im Cbx-Locus aufweisen. Sollten sich weitere Stämme genauso verhalten, könnte man Rückschlüsse auf eine mögliche Gendosis-Abhängigkeit ziehen.

5.3.4 Expression von *sr13864* im *S. reilianum* Hirseisolat führt zur Virulenzsteigerung auf Mais

Da SG200Δum00823#9 eine verringerte Virulenz aufwies und doppelte Integration von *sr13864* in SG200Δum00823#9 den Effekt teilweise zu komplementieren schien, sollte auch *sr13864* ein Virulenzfaktor für Maisinfektion sein. Um das zu überprüfen, wurde das Gen *sr13864* mit seinem nativen Promoter (2 kb) und dem nos-Terminator in den Cbx-Locus der SRH-Stämme von H2-7 (Paarungstyp a2b6) und H2-8 (Paarungstyp a1b1) integriert.

Es wurden Transformanten identifiziert, die das Gen ektopisch (ekt.) oder ausschließlich in den Cbx-Locus inseriert hatten. Von diesen Transformanten wurden kompatible Stämme miteinander gekreuzt und auf PD-Aktivkohle-Agar aufgetropft. Nach zwei Tagen wurde (sichtbar unter dem Binokular) eine schwache Filamentbildung beobachtet (nicht gezeigt), d. h., dass die Stämme in ihrem Paarungsvermögen nicht beeinträchtigt waren.

Für den Virulenztest wurden je ca. 25 Maispflanzen der Varietät Gaspé Flint mit einer Mischung aus den SRM WT-Stämmen 5-1 x 5-2, den SRH WT-Stämmen H2-7 x H2-8, den SRH Expressionsstämmen H2-7 x H2-8+*sr13864*_ekt. und H2-7+*sr13864* x H2-8+*sr13864* infiziert. Nach 7 Wochen wurden die weiblichen Blütenstände nach Symptomen untersucht

(Abb. 41). Dabei wurde der Blütenstand jeder Pflanze von ihren Hüllblättern befreit und genau betrachtet. Die Pflanzen wurden nach ihrem stärksten Symptom in eine von drei Kategorien eingeteilt: keine Symptome, Phyllodie oder Sporen. Die Bildung von Sporen bedeutet, dass der Pilz seinen Lebenszyklus vollenden kann. Phyllodiebildung ist ein schwächeres Symptom.

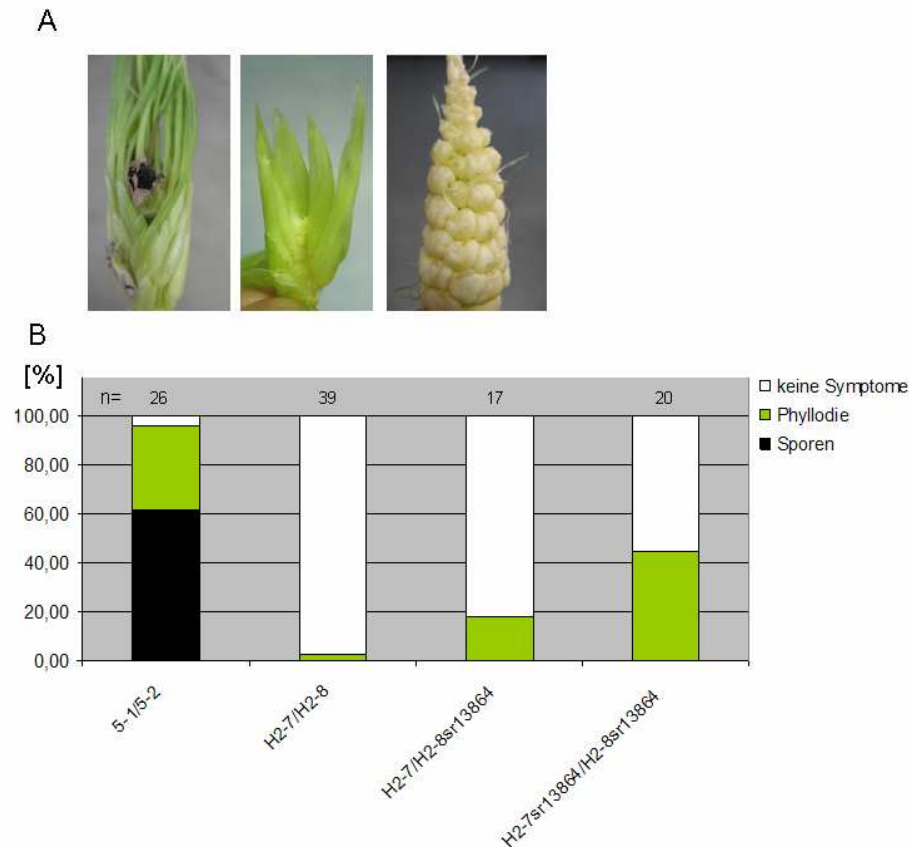


Abb. 41. Die Expression von sr13864 in SRH (H2-7/H2-8) erhöht die Virulenz auf Mais (Varietät Gaspé Flint). A. Sieben Wochen nach der Infektion wurden die weiblichen Blütenstände nach Symptomen untersucht. Die Kolben zeigten entweder Sporen- und Phyllodiebildung auf Mais (links, Abb. von J. Schirawski), Phyllodiebildung auf Mais (Mitte) oder keine Symptome (rechts, Abb. von J. Schirawski). B. Quantifizierung der Symptome in Maispflanzen der Varietät Gaspé Flint nach Infektion mit den Stämmen SRM (5-1/5-2), SRH (H2-7/H2-8) und den sr13864-exprimierenden SRH-Stämmen (H2-7/H2-8sr13864_ekt. und H2-7sr13864/H2-8sr13864). Jede Pflanze wurde in eine von drei Kategorien eingeteilt; Sporen, wenn mindestens ein Kolben Sporen aufwies, Phyllodie, wenn kein Kolben Sporen, aber mindestens ein Kolben Phyllodie aufwies, oder keine Symptome, wenn kein Kolben Sporen oder Phyllodie aufwies.

Die mit einer Kreuzung der SRM-Stämme 5-1x5-2 infizierten Pflanzen zeigten zu 98% Symptome in den weiblichen Blütenständen. 60% der Pflanzen zeigten Sporenbildung, 38% Phyllodie. Im Gegensatz dazu zeigten Pflanzen, die mit einer Mischung der SRH-Stämme H2-7xH2-8 infiziert worden waren, keine Sporenbildung und nur einen geringen Anteil an Phyllodie (3%). Pflanzen, die mit einer Mischung der SRH-Stämme H2-7xH2-8sr13864_ekt. infiziert waren, zeigten einen 6fachen Anstieg der Pflanzen mit Phyllodie nach Infektion, während der Anteil der Pflanzen mit Phyllodie nach Infektion mit einer Mischung der SRH-

Stämme H2-7+sr13864xH2-8+sr13864 auf 43% stieg, was einer ~15fachen Zunahme im Symptom Phyllodie entsprach. Damit könnte die Anzahl der Pflanzen mit Phyllodie proportional zur Anzahl der *sr13864*-Kopien zu stehen. Dies zeigt, dass die Expression von *sr13864* in SRH dessen Virulenz auf Mais erhöhen und *sr13864* als Mais-Virulenzfaktor wirken kann.

5.3.5 Expression von *sr13864* im *S. reilianum* Hirseisolat führt zur Bildung von roten Läsionen nach Infektion von Hirse

Um zu testen, ob *sr13864* als Avirulenzfaktor auf Hirse wirkt, wurden 14 Tage alte Hirsepflanzen (*Sorghum bicolor*, Varietät Golden Polish) mit einer Kreuzung der SRH-Stämme H2-7xH2-8, einer Kreuzung der SRH-Stämme H2-7xH2-8sr13864_ekt. und einer Kreuzung der SRH-Stämme H2-7+sr13864xH2-8+sr13864 infiziert. 7 bis 10 Tage nach der Infektion konnte die Bildung roter Läsionen auf dem Hauptleitbündel des dritten Blattes der Hirsepflanzen beobachtet werden (Abb. 42A). 16% der mit H2-7xH2-8 infizierten Pflanzen zeigten rote Läsionen, wobei 38% der mit H2-7xH2-8sr13864_ekt. und 40% der mit H2-7+sr13864xH2-8+sr13864 infizierten Pflanzen rote Läsionen zeigten (Abb. 42B).

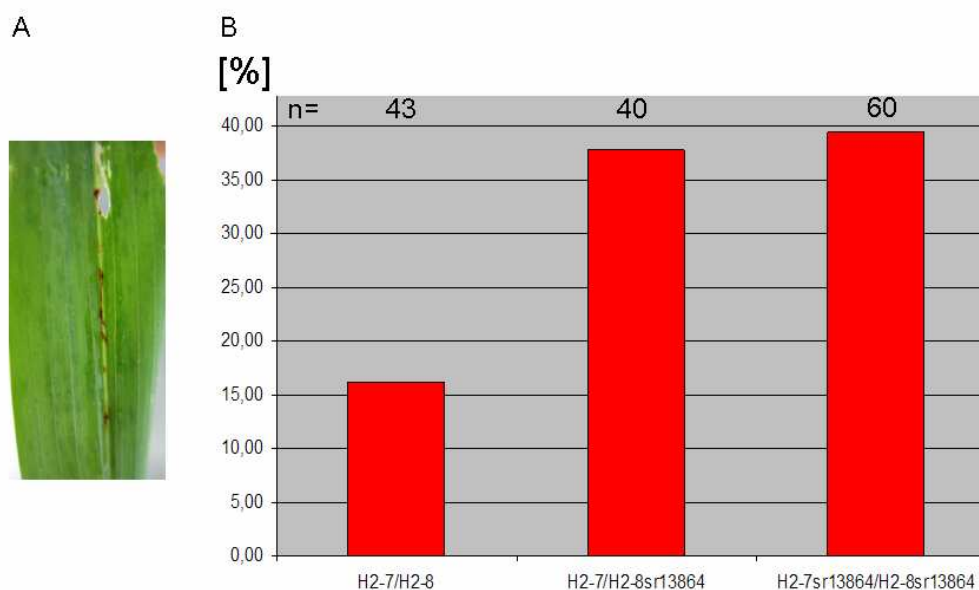


Abb. 42. Bildung roter Läsionen nach Infektion von Hirse mit *sr13864*-exprimierenden SRH-Stämmen. A. Drittes Blatt mit Hauptleitbündel, welches rote Läsionen nach Infektion mit den SRH-Stämmen H2-7+sr13864xH2-8+sr13864 aufweist. B. Hirsepflanzen, die mit SRH (H2-7xH2-8+sr13864_ekt) und SRH (H2-7+sr13864/H2-8+sr13864) infiziert worden waren, zeigten etwa doppelt so häufig rote Läsionen auf dem Hauptleitbündel. Dieses Experiment wurde einmal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Dieses Experiment deutet darauf hin, dass Hirse als Reaktion auf die Erkennung von *sr13864* mit einer erhöhten Abwehrreaktion in Form der roten Läsionen reagiert.

5.3.6 Expression von sr13864 im *S. reilianum*-Hirseisolat führt zu einer geringen Virulenzerniedrigung

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Bildung roter Läsionen der sr13864-exprimierenden SRH-Stämme in Hirse so beeinträchtigt, dass es zu einer Virulenzerniedrigung kommt, wurden 3,5 Monate nach der Infektion die Symptome in den Blütenständen infizierter Hirsepflanzen quantifiziert. Die Blütenstände wurden in drei verschiedene Kategorien eingeteilt: vollständige Ersetzung durch ein Sporenlager, teilweise Ersetzung durch ein Sporenlager und Phyllodie, keine Symptome (Abb. 43).

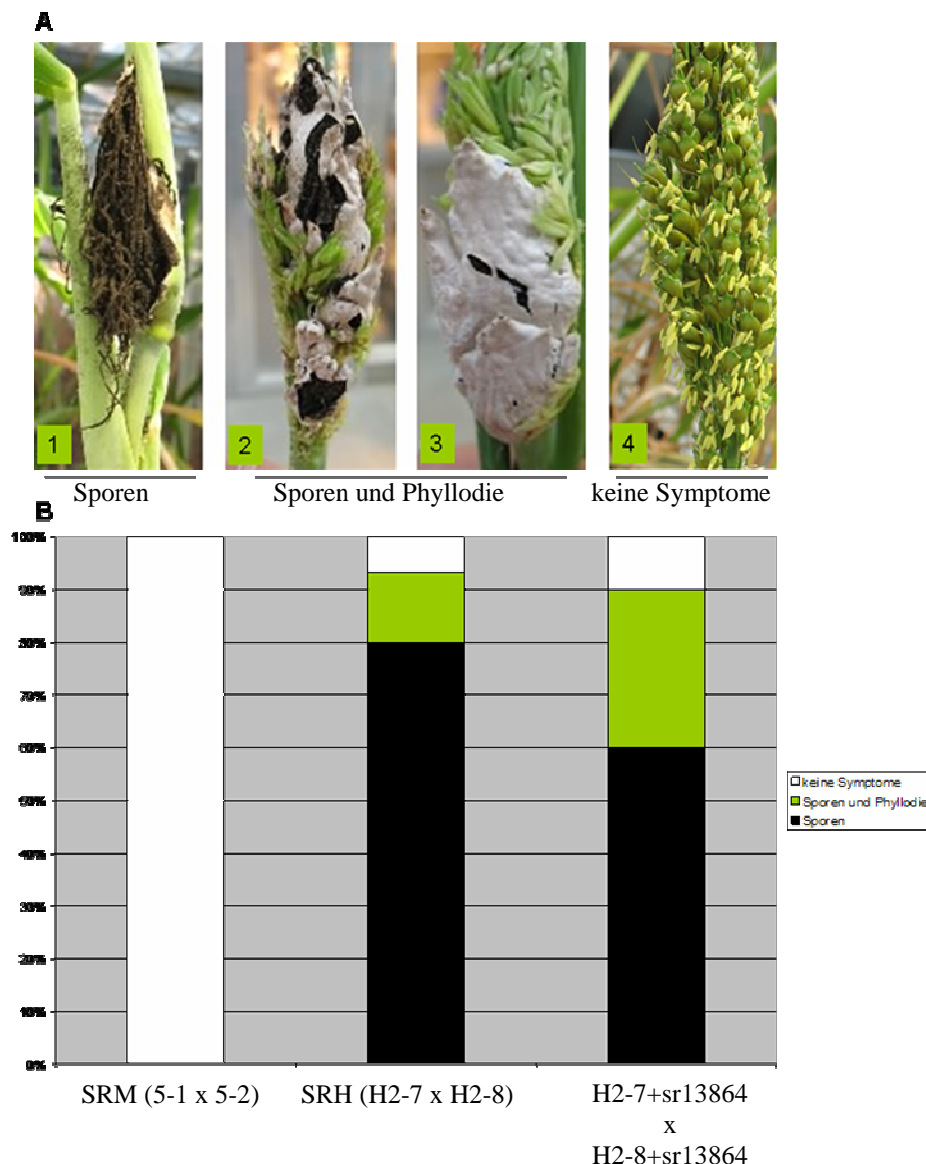


Abb. 43. Symptome auf Hirse 3,5 Monate nach der Infektion mit *S. reilianum*. Die Infektion von Hirse mit SRH und sr13864-exprimierenden SRH-Stämmen führte zu unterschiedlich starken Symptomen (A): Der Blütenstand ist vollständig durch ein Sporenlager (Sorus) ersetzt (1). Der Blütenstand ist teilweise durch Sporenlager und teilweise durch blattähnliche Strukturen ersetzt (2, 3) oder gesund (4). B. Virulenztest. Sporenbildung von *S. reilianum* Maisisolat (SRM, n=27) und *S. reilianum* Hirseisolat (SRH) ohne (n=30) oder mit Integration von sr13864 (n=40) auf Hirse.

Während keine der 28 mit einer Mischung der SRM-Stämme 5-1x5-2 infizierten Pflanzen Sporenbildung auf Hirse zeigte, kam es in 93% der mit einer Mischung der SRH-Stämme H2-7xH2-8 zu Sporenbildung (Abb. 43). 80% dieser Pflanzen zeigten eine vollständige Ersetzung des Blütenstandes gegen einen Sorus, während in 13% der Pflanzen eine nur teilweise Ersetzung des Blütenstandes gegen Sori mit gleichzeitiger Bildung blattähnlicher Strukturen (Phyllodie) beobachtet werden konnte (Abb. 43). Die Infektion mit den sr13864-exprimierenden SRH-Stämmen, führte bei 90% der Hirsepflanzen zu Sporenbildung. Allerdings betrug der Anteil an Pflanzen, bei denen der Blütenstand komplett durch einen Sorus ersetzt war, nur 60% (20% weniger als bei Infektion mit einer Mischung der SRH-Stämme H2-7xH2-8), während der Anteil an Pflanzen mit Sporen und Phyllodie jedoch um 30% gegenüber der SRH (H2-7xH2-8)-Infektion erhöht war (Abb. 43). Dies zeigt, dass die Expression von sr13864 in SRH zu einer Erniedrigung der Virulenz führt.

5.3.7 SRM auf Hirse löst eine besonders starke Bildung roter Läsionen aus.

Die roten Läsionen könnten eine verstärkte Immunabwehr der Pflanze bedeuten. Es könnte sein, dass dieser rote Farbstoff Anthocyan ist, wie es z. B. für Mais als Antwortreaktion auf Pathogenbefall beschrieben ist oder 3-Desoxyanthocyanidin-Phytoalexin (3-DAOC-P), eine Substanz, die ausschließlich für Abwehrreaktionen in Hirse beschrieben ist (Nicholson et al., 1987). Besonders stark fällt die Reaktion mit schwarz-rötlichen Läsionen aus, wenn Hirse mit SRM(5-1x5-5) infiziert wird (Abb. 44, rechts).

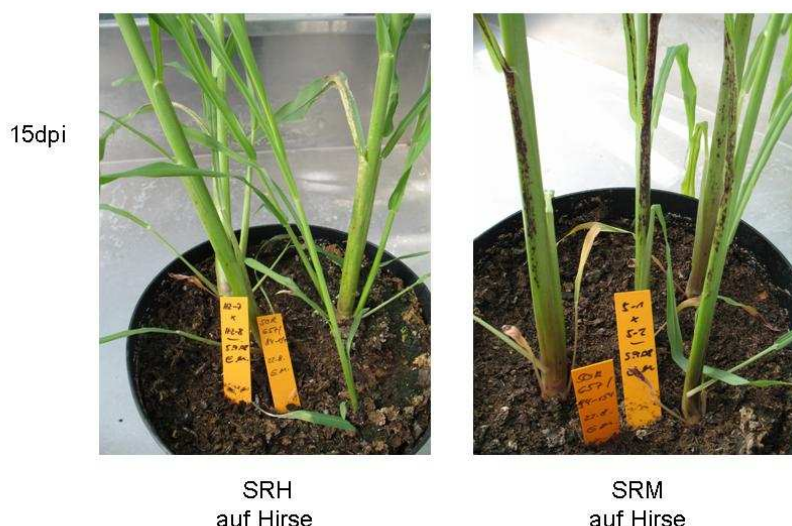


Abb. 44. Hirsepflanzen 15 Tage nach Infektion (15 dpi) mit SRH (H2-7xH2-8) (links) und SRM (5-1x5-2) (rechts). Während die SRH-Infektion zu wenigen Symptomen führte, hauptsächlich zu weißlichen Läsionen, so führte die SRM-Infektion zu einer starken Pflanzenreaktion mit schwarz-rötlichen Läsionen.

Diese Läsionen scheinen hauptsächlich entlang der Leitbündel aufzutreten (Abb. 45A). Bei mikroskopischer Betrachtung mit einem Konfokalmikroskop mit angeschlossener

Farbkamera wurden rote Läsionen in den Epidermiszellen detektiert. In diesen Läsionen befanden sich Hyphen, die von dem roten Farbstoff stärker angefärbt wurden als die umgebenden Epidermiszellen (Abb. 45B, C und D).

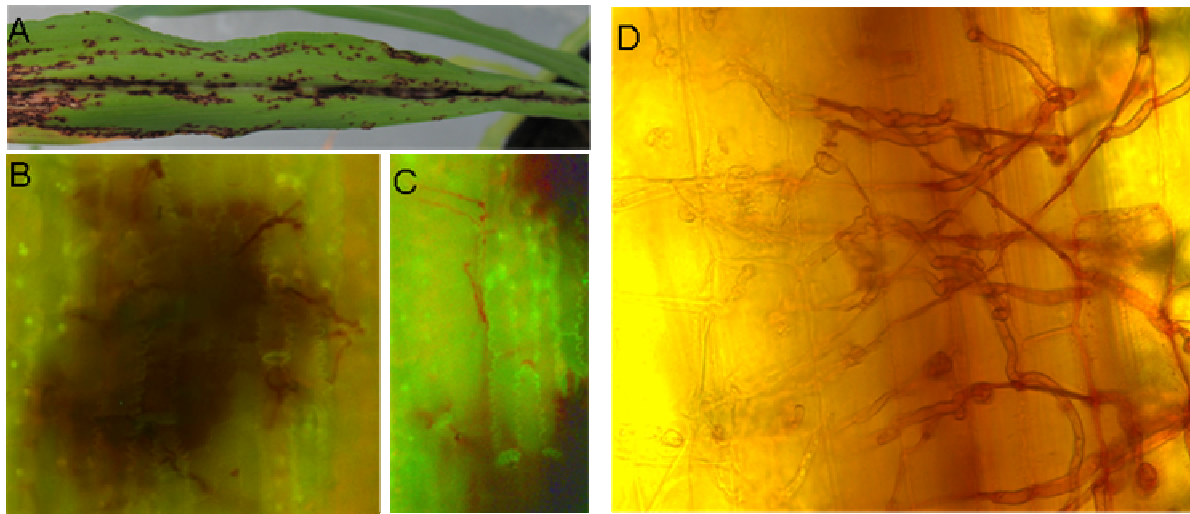


Abb. 45. Rote Läsionen durch Phytoalexinbildung in Hirse (*Sorghum bicolor*). A. Drittes Blatt 15 Tage nach Infektion mit SRM. B und C. Lichtmikroskopische Aufnahme einer roten Läsion mit Autofluoreszenz. SRM-Hyphen werden von Phytoalexin angefärbt. D. Lichtmikroskopische Aufnahme einer roten Läsion aus dem dritten Blatt 4 Tage nach Infektion (Abbildung zur Verfügung gestellt von J. Schirawski).

Um herauszufinden, ob die rot-schwarzen Verfärbungen auf die Substanz 3-DOAC-P oder auf Anthocyan zurückzuführen ist, wurde der Farbstoff mit Ethanol aus den Blättern extrahiert und per MALDI-TOF ein Massenspektrum aufgenommen (J. Kahnt, pers. Mitteilung, Abb. 46). Dies war notwendig, da ein Absorptionsspektrum mittels Photometer keinen Unterschied darstellen würde. In beiden Fällen würde sich das Absorptionsmaximum bei 525 nm befinden.

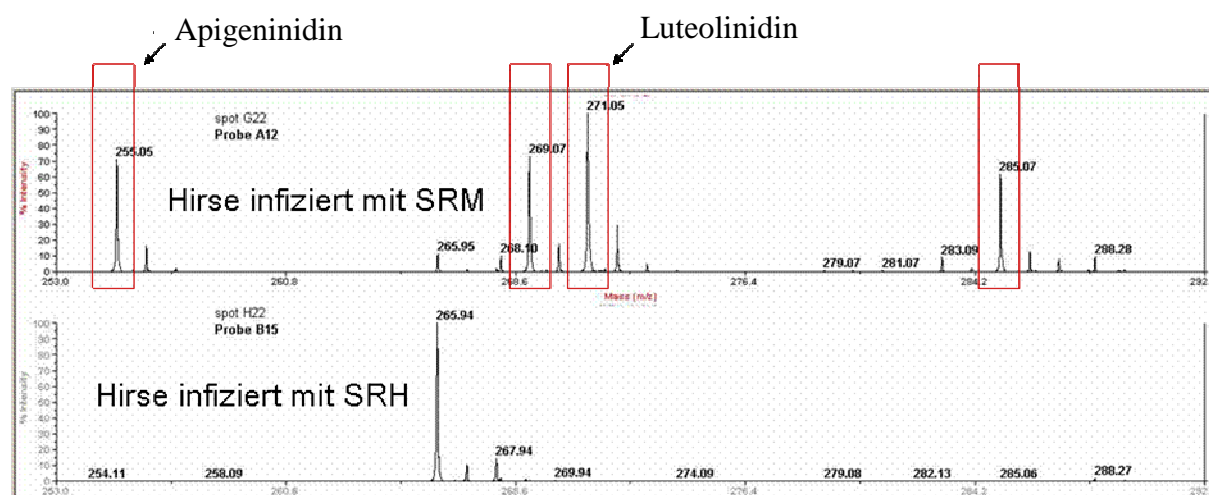


Abb. 46. Bildung der 3-Desoxanthocanidin-Phytoalexine (3-DOAC-P) bei Infektion von Hirse mit SRM (oben). Die Substanz mit einer Masse von $m/z=255$ ist Apigenininidin, die Substanz mit der Masse von $m/z=269$ die methylierte Form von Apigenininidin (Nicholson et al., 1987). Die Substanz mit der Masse $m/z=271$ könnte Luteolinidin sein, die Substanz mit der Masse $m/z=295$ die davon methylierte Form (Nicholson et al., 1987). Hirse infiziert mit SRH führte unter den verwendeten Bedingungen zu keiner

Bildung der 3-DOAC-P. Die charakteristischen Peaks fehlen hierbei. Bei beiden untersuchten Proben fehlte der für Anthocyan charakteristische Peak bei $m/z=603$ (Abb. modifiziert nach J. Kahnt).

In SRM-infiziertem Hirseextrakt wurden vier Peaks identifiziert, die nicht in SRH-infiziertem Hirseextrakt auftraten. Diese charakteristischen Massen stimmen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit den vier für 3-DOAC-P beschriebenen Substanzen, Apigeninidin, die methylierte Form des Apigeninidins, Luteolinidin und die methylierte Form des Luteolinidins, überein. Für eine sichere Bestätigung ist es notwendig, die Reinsubstanzen als Standards mitzuuntersuchen und die jeweils typischen Fragmentierungsmuster zu vergleichen. 3-DOAC-P repräsentieren für die Pathogenabwehr in Hirse charakteristische, sehr stabile Substanzen (Nicholson et al., 1987). Interessanterweise wurden diese Substanzen bei Infektion mit SRH nicht gebildet. Entweder wird SRH von der Hirse nicht erkannt und das Abwehrprogramm kann nicht gestartet werden, oder die Abwehr wird aktiv unterdrückt. Eine für Hirse beschriebene Anthocyanproduktion ($m/z=603$) wurde weder im SRH-Extrakt noch im SRM-Extrakt detektiert (nicht gezeigt). Anthocyanproduktion wird für Hirse als Reaktion auf UV-Strahlung beschrieben, nicht aber im Zusammenhang mit Pathogenabwehr (Nicholson et al., 1987). Dies kann den Grund haben, dass die Hirsepflanzen keiner übermäßigen UV-Bestrahlung ausgesetzt waren und dass deshalb die Anthocyanproduktion unterblieb. Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, dass unter den angewendeten Bedingungen keine Anthocyanmessung möglich war, da Anthocyan sehr instabil ist und die Ethanolextrakte für mehrere Tage bei RT gelagert wurden.

Extrakte von mit SRH+sr13864 (H2-7+sr13864/H2-8+sr13864) infizierten Pflanzen wurden bisher nicht analysiert. Detektion dieser Substanzen in den Extrakten würde ein Indiz dafür sein, dass die Expression von sr13864 in *S. reilianum* zur Bildung der rot/schwarzen Läsionen auf Hirse beiträgt.

6 Diskussion Teil 2

Das Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines möglichen Wirtsspezifitätsfaktors aus maispathogenen Pilzen, der Pathogenität auf Mais unterstützt, gleichzeitig die Nutzung anderer Wirte aber schwächt. Faktoren mit gleichzeitiger Virulenz- und Avirulenzfunktion sind bekannt aus anderen Organismen. So wurden z. B. in *Ralstonia solanacearum* (dem Erreger der bakteriellen Welke auf vielen Solanaceen, aber nicht auf Tabak-Pflanzen), drei Typ III-Sekretionseffektor-Gene entdeckt, die in den meisten Solanaceen und einigen anderen Wirtspflanzen Virulenz unterstützen, aber auf *Nicotiana*-Spezies die Virulenz verhindern (Poueymiro et al., 2009). In *Phytophthora sojae* wurden ebenfalls Avirulenzfaktoren gefunden, die eine Kompatibilität zwischen verschiedenen *P. sojae*-Varietäten und der Wirtspflanze Soja kontrollieren. So zeigt z. B. der *Avr3c*-Lokus aus avirulenten *P. sojae*-Stämmen eine Funktion als Avirulenzfaktor; mutierte *Avr3c*-Varianten in anderen *P. sojae*-Varietäten sind hingegen Virulenzfaktoren (Dong et al., 2009). Sollten auch in *S. reilianum* Faktoren existieren, die die Virulenz auf Mais unterstützen, die Nutzung anderer Wirte aber schwächen, dann könnte es im Laufe der Evolution des *S. reilianum* Hirseisolats (SRH) zu einem Genverlust gekommen sein. Deshalb haben wir mittels Genomvergleich nach Genen gesucht, die in den Maispathogenen SRM und *U. maydis* anwesend, in eng verwandten Pathogenen anderer Wirtspflanzen aber abwesend sind. Bei dieser Analyse wurde nur ein einziges Gen identifiziert: *sr13864* aus SRM bzw. sein Homologes *um00823* aus *U. maydis*. Dieses Gen wurde im Folgenden auf seinen Einfluss für die Infektion von *U. maydis* und *S. reilianum* auf Mais und auf Hirse getestet. Es stellte sich heraus, dass Anwesenheit von *um00823* in *U. maydis* bzw. *sr13864* in SRH die Virulenz der Stämme auf Mais fördert, während Expression von *sr13864* in SRH zu einer erhöhten Pflanzenantwort und einer leichten Virulenzreduktion auf Hirse führt. Damit hat *sr13864* eine duale Funktion als Virulenzfaktor für Mais und Avirulenzfaktor für Hirse und trägt damit zur Ausprägung der Wirtsspezifität von *S. reilianum* bei.

6.1 Gibt es nur einen Wirtsspezifitätsfaktor in *S. reilianum*?

Das in der vorliegenden Arbeit durch Genomvergleich detektierte Kandidatengen stellt den ersten identifizierten Wirtsspezifitätsfaktor aus *S. reilianum* dar. Kreuzungsexperimente zwischen SRM und SRH und anderen Nachkommen zeigten, dass deutlich mehr als ein Gen in die Wirtsspezifität involviert ist (J. Schirawski, pers. Mitteilung). Überprüfung der neun

getesteten Nachkommen aus einer Kreuzung von SRH und SRM zeigte, dass An- bzw. Abwesenheit von *sr13864* nicht mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der Virulenz auf Mais oder auf Hirse korreliert (nicht dargestellt). Das deutet darauf hin, dass *sr13864* nicht den einzigen Wirtsspezifitätsfaktor aus *S. reilianum* darstellt. Offenbar konnten mit den angelegten Kriterien über Genomvergleich nicht alle Faktoren ermittelt werden, die zur Wirtsspezifität beitragen. Dies könnte daran liegen, dass nur nach An- bzw. Abwesenheit der Gene in SRM bzw. SRH gesucht wurde, und gering konservierte Gene als in SRH anwesend und damit als „nicht relevant“ aussortiert wurden. Natürlich können besonders zwischen gering konservierten Genen funktionale Unterschiede bestehen, so dass diese ebenfalls als mögliche Wirtsspezifitätsfaktoren berücksichtigt werden sollten. (Abb. 36). Eine Analyse der AS-Identitätsverteilung (Abb. 36) zeigte, dass über 92% der SRM-Proteine in SRH hochkonserviert sind. Während es nur wenige Proteine mit mittlerer Konservierung gab, war der Anteil an Proteinen mit geringer Sequenzidentität erhöht (Abb. 33). Möglicherweise ist der erhöhte Anteil gering konservierter Proteine auf eine Selektion funktionaler Unterschiede zurückzuführen. Dies würde darauf hindeuten, dass eben diesen gering konservierten Proteinen eine Funktion in der Wirtsspezifität und damit in der Varietätenabgrenzung zukommen könnte (z. B. Jiang et al., 2008; Dong et al., 2009). Weiterhin ist vor allem für biotrophe Pilze bekannt, dass Wirtsspezifität oft nicht an eine An- oder Abwesenheit von wenigen Genen gekoppelt ist, sondern in der Existenz vieler polymorpher Gene begründet sein kann (Übersichtsartikel von van der Does und Rep, 2007; Dong et al., 2009).

Um herauszufinden, welche der 361 Gene geringer Konservierung zwischen SRM und SRH den größten Einfluss auf die wirtsspezifische Virulenz haben, wäre es möglich, mehr Nachkommen aus einer Intervarietätenkreuzung aus SRM x SRH zu generieren, deren Virulenz auf Mais und Hirse zu testen und auf An- oder Abwesenheit der 361 Kandidatengene zu testen. Durch Korrelation der Virulenzstärke mit der An- oder Abwesenheit bestimmter Kandidatengene könnten diese als besonders vielversprechend identifiziert und nachfolgend einzeln auf ihre Funktion als Wirtsspezifitätsfaktor getestet werden. Evtl. lassen sich durch diese Korrelationsanalyse auch ganze Gengruppen als wichtige Kandidaten identifizieren. Außerdem könnten damit auch Faktoren identifiziert werden, die Virulenz auf Hirse unterstützen und auf Mais erschweren.

Um einen vollständigen Überblick über die Unterschiede in Bezug auf alle im Genom vorhandenen Gene zu erlangen, könnte die preisgünstige Methode der Solexa-Sequenzierung mit der Generierung von kurzen „Read“-Längen angewendet werden, da bereits die Sequenzen von den beiden syntänen Genomen von SRH und von SRM zur Verfügung

stehen. Generell gilt, je mehr Genome von möglichst nah verwandten Organismen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität sequenziert sind, desto größer ist die Chance, Wirtsspezifitätsfaktoren durch Genomvergleich identifizieren zu können.

Genomvergleich ist ein wichtiges Mittel zur Identifikation von Genen, die in Wirtsspezialisierung involviert sind, und damit für das Verständnis von zugrunde liegenden Mechanismen, unverzichtbar.

Auch für andere Organismen führte die Anwendung eines Genomvergleichs zur erfolgreichen Identifikation von Wirtsspezifitätsfaktoren. So wurde das Genom des Proteobakteriums *Xanthomonas campestris campestris*, ein *A. thaliana*-Pathogen, mit dem Genom von *Xanthomonas axonopoda* pv. *citri*, der Zitrusbäume befällt, verglichen, um Wirtsspezifitätsfaktoren auf genetischer Ebene zu identifizieren (da Silva et al., 2002). 80% der beiden Genome waren konserviert, so dass innerhalb der übrigen 20% der gering bis gar nicht konservierten Bereiche die Gene vermutet werden, die als Wirtsspezifitätsfaktoren eine Rolle spielen (da Silva et al., 2002). Weiterhin wurden Pathogenese-assoziierte Gencluster aus acht verschiedenen *Xanthomonas*-Spezies miteinander verglichen (Lu et al., 2008). Dabei wurde festgestellt, dass Wirtsanpassung nur mit kleineren Änderungen in den Cluster-Regionen korrelierte, dass wahrscheinlich eher Änderungen außerhalb der Cluster und auf regulatorischer Ebene in die Wirtsanpassung involviert sind (Lu et al., 2008). Ein solcher Zusammenhang konnte kürzlich in zwei unterschiedlichen *Vibrio fischeri*-Isolaten nachgewiesen werden (Mandel et al., 2009). Ein Genomvergleich des Kalmar-infizierenden Isolats ES114 mit dem Fisch-infizierenden Isolat MJ11 zeigte, dass ein einzelnes regulatorisches Gen, kodierend für die Zwei-Komponenten-Sensor-Kinase RscS aus *V. fischeri* ES114 in *V. fischeri* MJ11 fehlte. Heterologe Expression von *rscS* in *V. fischeri* MJ11 hatte zur Folge, dass *V. fischeri* MJ11 Kalmar infizieren konnte (Mandel et al., 2009).

Die genannten Beispiele unterstützen die These, dass Wirtsspezifitätsfaktoren umso leichter identifiziert werden können, wenn die untersuchten Organismen eng miteinander verwandt sind, d. h. wenn es sich idealerweise um Varietäten derselben Art (Mandel et al., 2009) handelt. Ein Beispiel für sehr komplexe Wirtsspezifität-assoziierte Mechanismen sind Ectomycorrhiza, symbiontische Pilze von Pflanzen mit unterschiedlich großen Wirtsspektren. Untersuchungen mittels Microarray-basierter vergleichender Genomhybridisierung (CGH) an 35 verschiedenen *Paxillus involutus*-Stämmen, die aus vier voneinander unabhängigen Isolaten hervorgegangen sind, haben gezeigt, dass Wirtsadaptation mehrfach unabhängig voneinander erfolgt ist und wahrscheinlich nicht die gleichen Gene involviert hat (Hedh et al., 2009). Dies zeigt umso mehr, dass die Mechanismen zur Determination von

Wirtsspezifität sehr komplex sind, und dass zum Studium von Wirtsspezifität am besten Varietäten der gleichen Art mit unterschiedlicher Wirtsspezifität untersucht werden sollten, um die Datenauswertung möglichst zu vereinfachen. Der Vergleich zwischen SRH und SRM scheint dafür optimal zu sein, da nur 3% der beiden Genome Unterschiede aufweisen.

6.2 Kodierte *sr13864* für ein sekretiertes Protein?

Die bisherige Annotation für *sr13864* sieht im Vergleich zu seinem Homolog *um00823* ein N-terminal verkürztes Protein vor, welches kein Signalpeptid beinhaltet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der stromaufwärts des bisher annotierten Translationsstartpunkts befindlichen Sequenz lassen auf einen längeren offenen Leserahmen des Gens für *sr13864* schließen, der eine mit 690 Bp Sequenz besitzt, die gleich lang wie *um00823* ist. Darüber hinaus beinhaltet diese längere Sequenz auch ein Signalpeptid. Damit ist es wahrscheinlich, dass als Translationsstart von *sr13864* ein ACG-Codon dient. Aus anderen Organismen ist bekannt, dass auch alternative Startcodons verwendet werden können.

In Pflanzen, z.B. in Tabak, in Liliaceae und in Aloaceae besitzt das Plastid-kodierte (*NADH-Dehydrogenase*) *ndhD*-Gen ein ACG-Startcodon. Das ACG wird dann aber in den meisten Fällen im primären Transkript vollständig oder teilweise zu AUG editiert, wie mittels cDNA-Synthese der Translationsinitiationsregion überprüft werden konnte (Lopez-Serrano et al., 2001). Nur in Lauch (*allium ampeloprasum*) war auch auf cDNA-Ebene ausschließlich ACG vorzufinden, wobei nicht einwandfrei geklärt wurde, ob es sich hierbei um heterogene, überlappende Transkripte und einer unzureichenden Amplifikation des editierten Startcodons handelt, oder um ein funktionelles ACG-Startcodon (Lopez-Serrano et al., 2001). Es sind aber immer mehr Fälle bekannt, in denen Nicht-AUG-Startcodons Translation initiieren können (Chang et al., 2004, Tang et al., 2004). Vor allem, wenn das Nicht-AUG-Startcodon sich nur in einem Nukleotid unterscheidet, können auch Nicht-AUG-Startcodons erfolgreich Translation initiieren, wie einige Beispiele in höheren Eukaryoten und in Viren zeigen (Kozak, 1989). Die relative schwache Basenpaarung zwischen einem Nicht-AUG-Codon und einem Anticodon einer Initiator-tRNA könnte durch die Interaktion von benachbarten Nukleotiden, insbesondere einem Purin (A oder G) an Position -3 und einem „G“ an Position +4 kompensiert werden (Kozak, 1991, Pisarev et al., 2006). Diese Studien bezogen sich auf höhere Eukaryoten. Studien zur Translationsinitiation in Hefe legten dar, dass die Sequenz, die unmittelbar stromabwärts vom Startcodon folgt, ebenfalls eine Rolle in der Modulation der Effektivität der Translationsinitiation spielt, wobei der Einfluss doch von eher geringerer Bedeutung zu sein scheint (Cigan et al., 1987, Baim et al., 1988, Cigan et al., 1988). Drei

Hefe-Gene sind dafür bekannt, ein Nicht-AUG-Startcodon als Translationsstartpunkt zu besitzen. Das erste Gen ist *GRS1*, welches für eine der beiden Glycyl-tRNA-Synthetasen (GlyRS) in *S. cerevisiae* kodiert (Chang et al., 2004), das zweite Gen ist *ALAI*, welches für die Alanyl-tRNA-Synthetase (AlaRS) in *S. cerevisiae* kodiert (Tang et al., 2004), und *CARP2A* als drittes Gen kodiert für das saure ribosomale Protein P2A in *Candida albicans* (Abramczyk et al., 2003). Eine aktuelle Studie zeigte, dass die Translationseffizienz von Nicht-AUG-Codons signifikant von den Nukleotiden an deren relativer -3 bis -1-Position bestimmt wird, wobei das Nukleotid an Position -3 am meisten Einfluss auf die Translationseffizienz einnimmt (Chen et al., 2008). Das Nukleotid an Position +4 zeigt einen etwas geringeren Einfluss (Chen et al., 2008). Als Beispiel für eine favorisierte Sequenzumgebung geben die Autoren „AARuugA“ an, wobei „R“ ein „A“ oder „G“ repräsentiert; und „uug“ als Beispiel für ein Nicht-AUG-Startcodon dient (Chen et al., 2008). Auch das in der vorliegenden Arbeit analysierte *sr13864*-ACG-Startcodon besitzt an dessen relativer Position -3 und -2 ein A und an der Position +4 ebenfalls ein A. Damit unterstützen die Daten von Chen et al. (2008) die Vermutung, dass ACG im Fall von *sr13864* als Startcodon dienen kann. Interessanterweise treten die Nicht-AUG-Startcodons in den Fällen von *GRS1* und *ALAI* in Kombination mit einem stromabwärts folgenden *in-frame*-AUG-Startcodon auf (Chang et al., 2004, Tang et al., 2004, Huang et al., 2006). In beiden Fällen werden jeweils zwei Proteinisoformen kodiert, eine mitochondrial lokalisierte Form und eine zytoplasmatisch lokalisierte Form. Auch bei *sr13864* gibt es ein stromabwärts folgendes *in-frame*-AUG-Startcodon. Ob es auch hier zwei Proteinisoformen gibt, muss noch untersucht werden. Der Sequenzkontext des stromabwärts folgenden AUG entspricht nicht dem favorisierten Kontext (GUCAUGG). Jedoch sind AUG-Startcodons kaum sensitiv gegenüber ihrem Sequenzkontext (Chen et al., 2008), was bedeuten könnte, dass beide putativen Startcodons als Translationsinitiationsstellen dienen können. Im Fall von *ALAI* existieren gleich zwei aufeinanderfolgende ACG-Codons (Tang et al., 2004). Diese Redundanz könnte mit einer höheren Translationseffizienz in Verbindung stehen (Huang et al., 2006). Diese Hypothese wurde kürzlich von Chen et al. (2009) getestet. Dabei wurde herausgefunden, dass wichtiger als eine Redundanz des Nicht-AUG-Startcodons ein „A“ an Position +4 ist (Chen et al., 2009). Auch *sr13864* weist ein „A“ an Position +4 auf. Es ist anzunehmen, dass es in *S. reilianum* noch weitere Proteine gibt, deren Translationsstart von Nicht-AUG-Startcodons, insbesondere von ACG initiiert werden. Bisherige Gen-Vorhersage-Programme enthalten keine Algorithmen zur Vorhersage von möglichen alternativen

Translationsinitiationspositionen. Gene mit alternativen Startcodons könnten als Pseudogene übersehen worden sein.

Ob sr13864 ein sekretiertes Protein ist, kann bislang aber nicht beantwortet werden. Dafür müsste das Gen mit einem Tag (z. B. GFP oder HA) exprimiert und im Überstand mittels Immundetektion sichtbar gemacht werden. Sr13864 kann zwar nur teilweise und nur bei doppelter Integration die Virulenzreduktion des SG200Δum00823-Deletionsstamms komplementieren, aber dies reicht aus, um auf eine Sekretion dieses Proteins hinzudeuten. Das um00823-Protein wird eindeutig als sekretiert vorhergesagt. Wenn sr13864 zumindest teilweise die Funktion von um00823 übernehmen kann, so sollte es doch wenigstens auch zum Teil sekretiert werden. Nichtsdestotrotz ist es für einen klaren Beleg erforderlich, auch sekretiertes um00823 außerhalb der Pilzzelle zu detektieren.

6.3 Dient Phytoalexinbildung in Hirse als Abwehr einer SRM-Infektion?

Die Bildung von Phytoalexinen in Hirse (*Sorghum bicolor*) als Antwort auf Infektion mit dem SRM lässt erahnen, dass die Pflanze den Pilz erkannt hat und deshalb sein Abwehrprogramm zur Synthese der 3-Deoxyanthocyanidin-Phytoalexine (3-DOAC-P) initiiert. Es ist bekannt, dass Hirse 3-DOAC-P als Antwort auf Befall mit phytopathogenen Pilzen synthetisiert (Nicholson et al., 1987). Es wurde gezeigt, dass die Phytoalexine in subzellulären Vesikeln von Epidermiszellen gebildet werden, die von Pilzen penetriert werden (Snyder and Nicholson, 1990). 3-DOAC-P-Bildung in Kombination mit H₂O₂-Produktion wurde auch in einer resistenten Hirse-Varietät nach Infektion mit *C. sublineolum* beobachtet (Basavaraju et al., 2009). Offenbar scheint die 3-DOAC-P-Produktion in Hirse, wie von Nicholson et al. (1987) vorgeschlagen, ein genereller Abwehrmechanismus nach Infektion mit Pilzen zu sein. Die Akkumulation von Phytoalexinen wurde in Hirse in der vorliegenden Studie nach Infektion mit einer Mischung der SRM-Stämme 5-1 und 5-2 bevorzugt in Epidermiszellen beobachtet (Abb. 45B und C).

Interessant ist, dass der Phytoalexin-Farbstoff offenbar eine hohe Affinität für Hyphen besitzt. Die Hyphen werden vom Phytoalexin stärker angefärbt als die umgebenden Epidermiszellen (Abb. 45). Die fungizide Wirkung von 3-DOAC-P ist zwar beschrieben worden (Snyder et al., 1990), der Wirkmechanismus ist aber nicht geklärt. Es könnte sein, dass die Zellwand und -membran von *S. reilianum* für 3-DOAC-P permeabel sind.

Es wurde bereits diskutiert, dass die 3-DOAC-P-Bildung Ähnlichkeiten zur hypersensitiven Reaktion (HR) aufweist, da es sowohl nach einer HR als auch nach Phytoalexininduktion zur Nekrose des umgebenden pflanzlichen Gewebes kommt (Gilchrist, 1998). Basavaraju et al.

(2009) haben kürzlich demonstriert, dass Phytoalexin-Bildung in Hirse mit H_2O_2 -Entwicklung einhergeht. Ob dies auch bei der Phytoalexinbildung als Antwort auf *S. reilianum* der Fall ist und wie unterschiedlich die Antwort in Bezug auf SRM oder SRH ausfällt, muss noch geklärt werden.

6.4 Welche Rolle spielen die Leitgewebe bei Infektion und Abwehr von *S. reilianum* und wie wichtig sind sie für die Pathogenabwehr?

S. reilianum ist ein systemisches Pathogen und bildet Sporen in den Infloreszenzen. Dies bedeutet, dass er von der Penetrationsstelle aus zur Infloreszenz vordringen muss. Mittels Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich der Pilz zunächst in der Epidermis proliferiert und dann in die Leitbündelscheidezellen eindringt und sich wahrscheinlich von der dort vorliegenden Stärke ernährt. Nach einiger Zeit wandern die Hyphen ins Innere der Leitbündel ein und proliferieren in den Geleitzellen des Phloems (Abb. 34).

Die Leitbündel könnten als Routen für den Pilz durch die Pflanze dienen. Weiterhin deuten Mikroskopieaufnahmen des Pflanzengewebes, in dem sich die Sporen befinden, darauf hin, dass es sich zumindest zum Teil um Leitbündelgewebe handelt, da das charakteristisch geformte Xylem identifiziert werden konnte (Abb. 47).

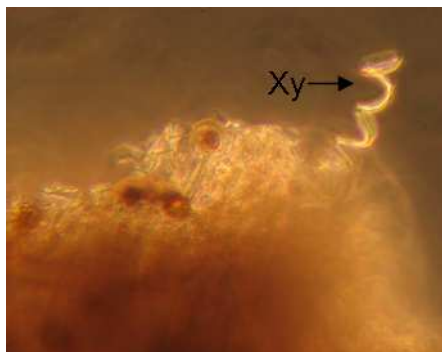


Abb. 47. Lichtmikroskopische Aufnahme des Sorus-Gewebes. Das charakteristisch geformte Xylem (Xy) kann im Randbereich detektiert werden.

Auch in *Sorosporium provinciale* (einem weiteren Vertreter aus der Gattung *Sporisorium* und dem Erreger des Staubbrennes auf Prairiegras, *Andropogon gerardii*) wurde mittels licht- und elektronenmikroskopischer Aufnahmen festgestellt, dass der Pflanzengewebeanteil der Sori vor allem aus Leitbündelgewebe besteht (Snetselaar und Tiffany, 1990). Sollte *S. reilianum* für die Sporenbildung die Blütenentwicklung unterdrücken können und nach Einwanderung in das meristematische Infloreszenz-Primordium dieses so umprogrammieren können (<http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/1502/bst0331502f01.htm>), dass daraus Leitbündelgewebe entsteht? Die Leitbündel könnten dem Pilz dann nicht nur die Migration in der Pflanze ermöglichen, sondern könnten auch Substanzen zu liefern, die für die

Sporenbildung im Bereich der umgewandelten Infloreszenz unterstützend sind. Um sich gegen systemische Infektionen, wie durch *S. reilianum* verursacht, zur Wehr zu setzen, ist es für die Pflanze hilfreich, Abwehrmechanismen im Leitbündelgewebe zu induzieren. Die 3-DOAC-P-Bildung wurde in älteren Geweben hauptsächlich entlang der Leitbündel beobachtet (Abb. 45), wahrscheinlich, weil sich dort der Pilz befand und weil die 3-DOAC-P-Bildung nicht nur auf Epidermiszellen (Nicholson et al., 1987) beschränkt sein könnte. Es gibt aber auch Beispiele für eine direkte Funktion der Leitbündel in pflanzlichen Abwehrmechanismen. In einer Insekten-resistenten Maisvarietät wurde die primäre Lokalisation der für die Resistenz verantwortlichen defensiven Cystein-Protease im Phloem beobachtet (Lopez et al., 2007). Darüber hinaus sind intensive Studien zu in der systemischen pflanzlichen Abwehr involvierten Signalstoffen wie Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Stickstoffoxid (NO) durchgeführt worden. Es wird seit langem vermutet, dass diese Substanzen mit systemischem Transport in Siebröhren des Phloems über lange Distanzen in Verbindung stehen könnten (van Bel und Gaupels, 2004). Als wahrscheinlichster Kandidat für ein solch mobiles Element, welches als Stress-Signal über lange Distanzen wirkt, wird NO diskutiert und konnte bereits in den Leitgefäßen nachgewiesen werden (Corpas et al., 2004; Gabaldon et al., 2005; Valderrama et al., 2007; Gaupels et al., 2008). Gaupels et al. (2008) konnten zeigen, dass der primäre Ort der NO-Produktion in den Geleitzellen des Phloems liegt. NO-Produktion wird wahrscheinlich infolge einer H₂O₂-Produktion gebildet (Delledone et al., 1998, 2001; de Pinto et al., 2002) und trägt zur Resistenz gegen Pathogenbefall bei (Asai und Yoshioka, 2009). NO dient u. a. als Signalmolekül für die Produktion von Phytoalexinen (Modolo et al., 2002, Xu et al., 2005). In Sojabohnen (*Glycine max*) verursachte die Inokulation mit einem pilzlichen Elizitor aus *Diaporthe phaseolorum* zunächst mittels eines konstitutiven NO-Synthase (NOS)-ähnlichen Enzyms NO-Bildung, was dann die Biosynthese von antimikrobiellen Flavonoiden induzierte (Modolo et al., 2002). Sollte auch in Hirse die Produktion der Phytoalexine an eine Geleitzellen-assoziierte NO-Synthese gekoppelt sein, könnte das einerseits erklären, warum die Phytoalexinproduktion so effizient entlang der Blattadern zu beobachten war (Abb. 45), und andererseits möglicherweise auf einen Zusammenhang zwischen Lokalisation des Pilzes in den Geleitzellen und der pflanzlichen Abwehr in den Geleitzellen hindeuten. Vielleicht muss der Pilz in die Geleitzelle eindringen, um vor Ort die Pflanzenabwehr und eine damit verbundene NO-Produktion zu verhindern.

6.5 Ist *sr13864* ein gewebespezifischer Avirulenzfaktor für Hirse?

Rote Läsionen, die wahrscheinlich Phytoalexinbildung repräsentieren, wurden auch in geringerem Ausmaß und verspätet nach Infektion mit einer Mischung kompatibler *sr13864*-exprimierender SRH-Stämme (H2-7*sr13864* x H2-8*sr13864*) beobachtet. Dabei schien die Phytoalexinbildung ausschließlich direkt entlang der Leitbündel aufzutreten. Ein solches Phänomen ist bisher in der Literatur für Hirse nicht beschrieben worden. Vielleicht wird *sr13864* ausschließlich in den Leitbündeln synthetisiert (Abb. 48) und das gebildete Protein wird dort vom Produkt des korrespondierenden Resistenzgens (R-Gen) von der Pflanze erkannt (Abb. 48, 3), vielleicht gibt es aber auch nur in den Leitbündeln eine gewebespezifische Expression eines R-Gens der Pflanze (Abb. 48). Da außerdem das *S. reilianum* Maisisolat Probleme zeigte, in den Geleitzellen zu proliferieren, könnten die Geleitzellen grundsätzlich kritisch für die Pilz-Erkennung sein. Deshalb wurde ein Modell erstellt, in dem *sr13864* in den Geleitzellen des Phloems durch Produkte von R-Genen, die Rezeptoren für *sr13864* sind, erkannt wird (Abb. 48).

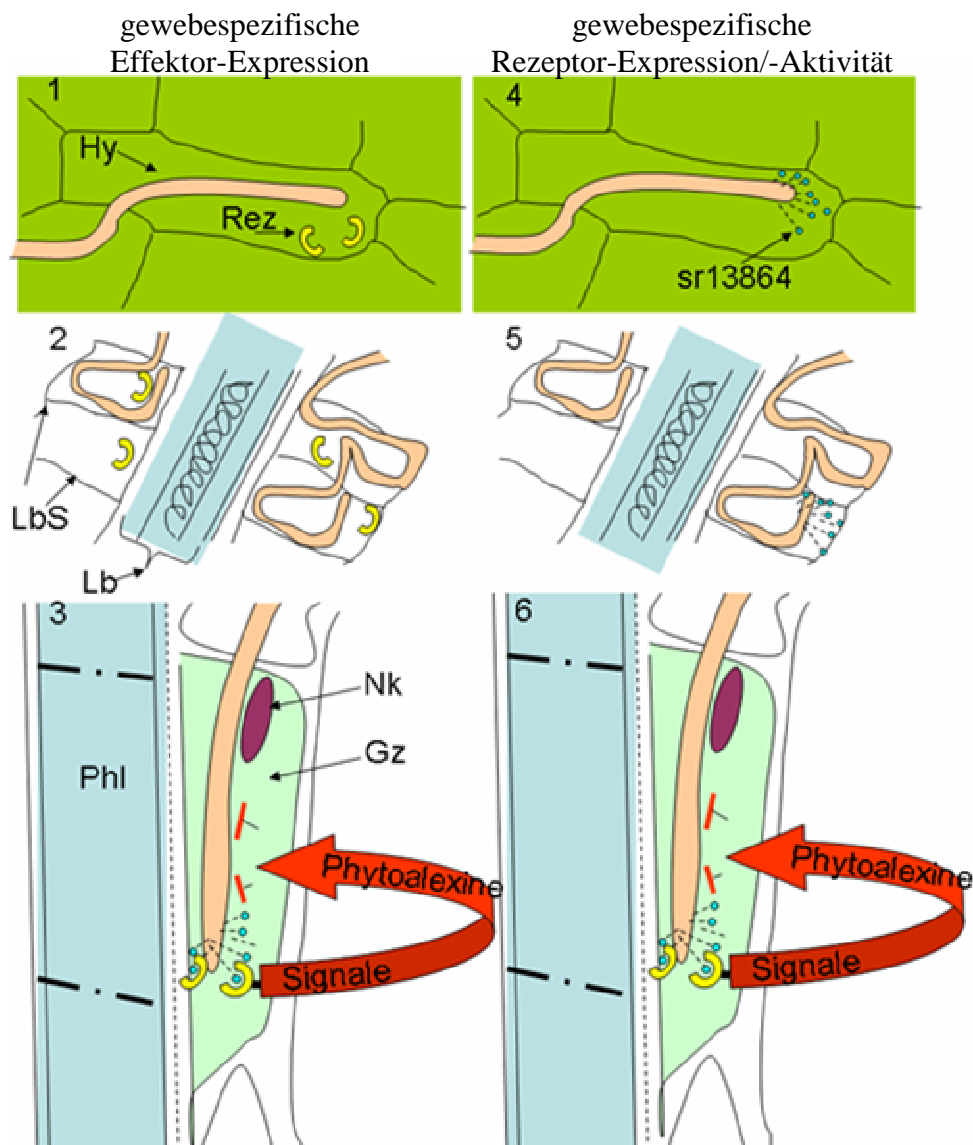


Abb. 48. Hypothesen zur Detektion von *sr13864* als Avirulenzfaktor in Hirse. Nicht dargestellt ist die Pflanzenzellmembran, die die Hyphe ummantelt. Ob die mögliche Erkennung von *sr13864* durch die Pflanze innerhalb des apoplastischen Raums oder innerhalb der Pflanzenzelle stattfindet, wird in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Da die Abwehrreaktion in Form der roten Läsionen nicht in Epidermiszellen auftritt, wird *sr13864* in den Epidermiszellen entweder nicht produziert (1), oder es gibt keinen pflanzlichen Rezeptor (4), der das Protein wahrnehmen könnte. In den Leitbündelscheidezellen (2, 5) könnte es genauso aussehen. Beim Eindringen der Hyphen in die Geleitzellen des Phloems könnten die pflanzlichen Rezeptoren das nun sekretierte *sr13864* binden und verschiedene Signale aktivieren, die in der Bildung der Phytoalexine resultieren (3), oder der Rezeptor, der *sr13864* erkennt, ist nur in den Geleitzellen lokalisiert und kann deshalb die Bildung der Phytoalexine in den Geleitzellen induzieren. Hyphen (Hy), Rezeptor (Rez), Leitbündelscheidezellen (LbS), Leitbündel (Lb), Phloem (Phl), Nukleus (Nk), Geleitzelle (Gz).

Obwohl es nach Infektion mit *sr13864*-exprimierenden SRH-Stämmen zu einer verstärkten Bildung roter Läsionen entlang der Blattadern kommt (Abb. 42), wird die Sporenbildung von *sr13864*-exprimierenden SRH-Stämmen nicht verhindert. Es scheint aber eine Reduktion in der Anzahl der Pflanzen zu geben, deren Blütenstand vollständig durch einen Sorus ersetzt ist. Damit scheint es, als würde *sr13864* auf Hirse einen virulenzreduzierenden Effekt haben.

Um zu überprüfen, ob *sr13864* tatsächlich als Avirulenzfaktor fungiert, wäre es im Folgenden interessant, das Protein aufzureinigen und direkt mit Hirse in Kontakt zu bringen, um festzustellen, ob es evtl. allein auf Grund der Anwesenheit von *sr13864* zu einer Abwehrreaktion z. B. in Form von Phytoalexinbildung kommen könnte.

Da die Anwesenheit des Proteins bei der Infektion von Mais die Bildung von Phyllodie förderte, scheint es auf Mais einen virulenzunterstützenden Effekt auszuüben. Vielleicht gibt es in Mais kein für *sr13864* sensitives R-Gen. Damit könnte *sr13864* als Virulenzfaktor wirken. Die Virulenzfunktion auf Mais könnte in der Unterdrückung der Wirtsantwort durch Maskierung anderer Effektoren liegen oder durch aktive Blockierung der Pflanzenantwort mittels direktem Angriff auf Wirtsabwehrproteine. Auch eine Inhibition mit der Proteinsekretion der Pflanzenzelle ist denkbar, wie kürzlich für einen Effektor aus *X. campestris*, XopJ, beschrieben wurde, der mit Zellwand-assoziierten Abwehrprozessen interferiert (Bartetzko et al., 2009). Am besten untersucht sind sekretierte Effektoren aus Oomyceten. Apoplastische Effektoren verbleiben im apoplastischen Raum zwischen der Pilzzellwand und der Pflanzenzellmembran, und zytoplasmatische Effektoren werden mittels eines RXLR-Motivs in die Pflanzenzelle transloziert (Birch et al., 2006; Kamoun et al., 2006; Whisson et al., 2007). Während für apoplastische Effektoren aus Oomyceten einige Funktionen als Protease- und Glucanase-Inhibitoren bekannt sind (Rose et al., 2002; Tian et al., 2004; Tian et al., 2005), so wurden cytoplasmatische Effektoren durch ihre Avirulenzfunktionen gefunden, die zu einer durch die korrespondierenden R-Gene der Pflanze vermittelten HR führten (Shan et al., 2004; Rehmany et al., 2005). Während einige RXLR-Effektoren zur Suppression der Wirtsantwort während der biotrophen Phase beitragen (Bos et al., 2006; Dou et al., 2008), sind andere RXLR-Effektoren auch während der nekrotrophen Phase hochreguliert (Dong et al., 2009) und könnten evtl. eine für die nekrotrophe Phase erwünschte HR vermitteln. Für *U. maydis* ist bisher ein apoplastischer Effektor, *Pep1*, beschrieben worden, der aktiv die HR während der Penetration unterdrückt (Doehlemann et al., 2008). In die Pflanzenzelle translozierte Effektoren sind für Brandpilze bisher nicht bekannt. Es ist möglich, dass auch *sr13864* im Apoplasten lokalisiert und dort mit sekretierten Pflanzenabwehrproteinen interagiert, da auch ein RXLR-ähnliches Motiv, welches eine Aufnahme in die Pflanzenzelle wahrscheinlich macht, fehlt. Um pflanzliche Interaktionspartner zu finden, könnte ein Hefe-2-Hybrid-Versuch mit einer pflanzlichen cDNA-Bibliothek durchgeführt werden oder auch Co-Immunopräzipitationsstudien.

6.6 Evolution von Effektorgenen

Der kürzlich in *U. maydis* beschriebene sekretierte Effektor Pep1 ist zur Pflanzenzellpenetration notwendig (Doehlemann et al., 2009). Deletion von *Pep1* hat Apathogenität in *U. maydis* zur Folge. Pep1 scheint ein konservierter Virulenzfaktor zu sein, da das Homolog in *Ustilago hordei* in der Lage war, den Phänotyp zu komplementieren. Offenbar ist Pep1 nicht auf eine *U. maydis*/Mais-Interaktion beschränkt, was eine Funktion als Wirtsspezifitätsfaktor ausschließt. Anders ist dies im Fall von *sr13864/um00823*. Da beide Gene nur in Maispathogenen vorkommen, schließt dies eine Funktion als konservierten Virulenzfaktor aus. Es könnte aber durch seine ausschließliche Anwesenheit in Maispathogenen eine Funktion als Wirtsspezifitätsfaktor ausüben. Auch ist der *U. maydis*Δ*um00823*-Deletionsstamm nur in der Virulenz reduziert, statt apathogen zu sein wie der Δ*pep1*-Stamm. Da Wirtsspezifität in biotrophen Pilzen mit einer Vielzahl an involvierten Genen korreliert, ist eine komplette Apathogenität durch Ausschalten eines einzelnen Wirtsspezifitätsfaktors nicht zu erwarten. Es kann sein, dass der Beitrag eines einzelnen Wirtsspezifitätsfaktors zur Virulenz durch die Vielzahl der involvierten und vielleicht auch in der Funktion ähnlichen Gene gar nicht messbar ist (Übersichtsartikel von van der Does und Rep, 2007). Eine Theorie ist, dass Wirtsspezifitätsfaktoren als Virulenzfaktoren eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate haben, welche mit einem ständigen Wettrüsten zwischen dem Pathogen und seinen Wirts-Zielproteinen einhergeht (Maor und Shirasu, 2005). Eine andere Theorie ist, dass solche Wirtsspezifitätsfaktoren auch durch horizontalen Gentransfer (HGT) von einem Pathogen auf ein anderes Pathogen übertragen werden können. Ein solches Szenario ist nun für nekrotrophe Pilze nachgewiesen worden. So wurde ToxA von *Stagonospora nodorum* auf *Pyrenophora tritici-repentis* übertragen. Damit wurde *P. tritici-repentis* zum Weizen-Pathogen. Der Mechanismus, durch den sich *sr13864/um00823* als Wirtsspezifitätsfaktor evolviert haben könnte, ist nicht eindeutig nachzuvollziehen. Da es in den nah verwandten bisher sequenzierten Spezies absolut keine (Teil-) AS-Sequenz gibt, die auch nur geringe Sequenzidentität zu *sr13864/um00823* aufweist, trifft die Theorie mit der hohen Mutationsrate und dem Wettrüsten wahrscheinlich nicht zu. Stattdessen ist es möglicherweise zu horizontalem Gentransfer, möglicherweise durch ein anderes bisher nicht sequenziertes Maispathogen gekommen. Ein Indiz ist die nicht-syntäne und zugleich komplett unterschiedliche Lokalisation der beiden Gene in den jeweiligen Genomen. *sr13864* und *um00823* befinden sich beide im Telomerbereich von Chromosomen (Chromosom 7 im Fall von *sr13864* und Chromosom 1 im Fall von *um00823*). Telomerregionen sind auf Grund ihrer chromosomalen Instabilität und teilweisen Ungeschütztheit (de Lange et al., 2005) eher

suszeptibel für die Aufnahme von Fremd-DNA (Haviv-Chesner et al., 2007; Gladyshev et al., 2007; Gladyshev et al., 2009). Je näher Gene am Telomer lokalisiert sind, desto höher ist außerdem die Wahrscheinlichkeit, dass sie bei ungleichmäßigem Crossing-over in der Meiose wieder verlorengehen. Interessant wäre, herauszufinden, ob das Hirseisolat möglicherweise *sr13864* im Zuge der Adaptation an Hirse verloren hat. Das könnte erklären, warum es scheint, als würde Hirse *sr13864* in den hier vorgestellten Experimenten erkennen können. Es wäre interessant, *sr13864/um00823* in *U. hordei* (Gerstepathogen) und *S. scitamineum* (Zuckerrohrpathogen) zu exprimieren und zu testen, ob es in ihnen auch zu einer verstärkten Abwehrreaktion kommt. Das könnte einen Hinweis liefern, ob *sr13864* ein generelles für die Pflanze erkennbares PAMP ist oder ob es der Anwesenheit eines speziellen R-Gens bedarf. *Sr13864/um00823* scheint eine Rolle als Wirtsspezifitätsfaktor innezuhaben mit gleichzeitiger Funktion als Virulenzfaktor in Mais und als Avirulenzfaktor in Hirse, wobei bisher nicht klar ist, wie und zu welchem Zeitpunkt in der Evolution der Ustilaginomyceten dieses Gen akquiriert bzw. erstmalig gebildet wurde.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle	Name	Bezugsquelle
α -32P-dATP	Hartmann Analytic (Braunschweig)	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)	DNA degr. Free Acid	Sigma (Deisenhofen)
Agarose medium EEO	Biomol (Hamburg)	DPBS	Biochrom, Berlin
Ammoniumnitrat	Roth (Karlsruhe)	EDTA	Merck (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)	Eisen(III)Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Aminobenzoessäure	Sigma (Deisenhofen)	Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)	Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
APS	Roth (Karlsruhe)	Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Agar	Difco (Detroit)	Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)	Ethylacetat	Merck (Darmstadt)
BSA Fraktion V	Roth (Karlsruhe)	Ethylformiat	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)	Glukose	Roth (Karlsruhe)
Carboxin	Riedel-de Haen (Seelze)	L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
Casaminoacids	Difco (Detroit)	Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)	H ₂ O, für molekularbiologische Zwecke	Braun (Melsungen)
Coomassie-Brilliant R250	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies

Name	Bezugsquelle	Name	Bezugsquelle
	(Karlsruhe)		
	(Karlsruhe)(Eggenstein)	Ca-Pantothenat	Sigma (Deisenhofen)
HygromycinB	Duchefa (Haarlem, NL)	Paraffinöl	Merck (Darmstadt)
IPTG	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)	Pepton	Difco (Detroit, US)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)	Phenol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)	Polyethylenglycol (PEG 4000)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)	Potato-Dextrose	Difco (Detroit, US)
Kaliumnitrat	Roth (Karlsruhe)	Proteinase K	Sigma (Deisenhofen)
Kupfersulfat	Roth (Karlsruhe)	Pyridoxin	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)	Riboflavin	Sigma (Deisenhofen)
Manganchlorid	Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)	Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)	Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)	Sorbitol	Sigma (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)	TEMED	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)	Thiamin	Sigma (Deisenhofen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)	Tris	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)	TritonX-100	Sigma (Deisenhofen)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)		GibcoBRL Life Technologies (Karlsruhe) (Eggenstein)
Natriummolybdat	Merck (Darmstadt)	Trypton	
Nicotinsäure	Sigma (Deisenhofen)	Toluol	Merck (Darmstadt)?
Nourseothricin	Werner Bioagents (Jena)	X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Orange G	Sigma (Deisenhofen)	Zinkchlorid	Merck (Darmstadt)

7.1.2 Kits

Name	Bezugsquelle	Name	Bezugsquelle
BD OpteiA Set Human IL-6	BD Biosystems (Heidelberg)	Minelute PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)	pCR2.1-TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen (Hamburg)
Sureclean Kit	Bioline (Luckenwalde)	peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I	peqLAB (Erlangen)
Dig-Labeling und Detection-Kit	Roche (Penzberg)	QIAExpressionist	Qiagen (Hilden)
GenElute Gel Extraction Kit	Sigma (Taufkirchen)	QIAGEN Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma (Taufkirchen)	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Innuprep-PCR-Purification Kit	Jena-Analytik (Jena)	SuperScriptIII Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Minelute GelExtraction Kit	Qiagen (Hilden)	Topo TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

7.1.3 Enzyme und Proteine

Name	Bezugsquelle
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Amersham (Braunschweig)
Lysozym	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Novozym 234	Novo Nordisc (Kopenhagen, DN)
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
RNAse A	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Taq-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)

7.1.4 Sonstige Materialien

Material	Bezugsquelle
Blottingpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Falcon-Röhrchen (15ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Nylonmembran	Roche (Penzberg)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
PVDF-Membran	Amersham
Röntgenfilm Kodak X-Omaz XAR-5	VWR (Darmstadt)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)

7.1.5 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben wurden alle Puffer und Lösungen mit H₂O bidest. angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
AE-Puffer (RNA-Präparation)	50 mM Na-Acetat, pH 5,3, 10 mM Na ₂ -EDTA
Ampicillin-Lösung	10 mg/ml Ampicillin
Antikörperlösung	1:20000 Anti-Digoxigenin-AP in DIG2
BSA-Stammlösung	100 mg/ml BSA
Carboxin-Lösung	2 mg/ml Carboxin in Methanol
CDP-Star-Lösung	100 µl-CDP-Star (Roche) in 10 ml DIG3
DIG1	0,1 M Maleinsäure 1% (w/v) SDS 0,15 M NaCl mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH 7,5
DIGII	10% (v/v) Blockierungslösung in DIG1
DIGIII	0,1 M Maleinsäure

Bezeichnung	Zusammensetzung
	0,1 M NaCl 0,05 MgCl ₂ mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH 9,5
DIG-Waschpuffer	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1
DNA-Auftragspuffer (10x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 50 % (w/v) Saccharose 10 mM Tris-HCl, pH 7,9 1 mM Na ₂ -EDTA
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Lyse-Puffer (DNA-Präparation aus <i>U. maydis</i>)	2,0 % (w/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Na ₂ -EDTA
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
PCR-Puffer (Taq DNA-Polymerase)	10 mM Tris/HCl, pH 8,3 50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂
Phenol/AE	50 % (v/v) Phenol, 50 % (v/v) AE-Puffer
Phenol/Chloroform	50 % (v/v) Phenol, 50 % (v/v) Chloroform
Salzlösung nach Holliday	16,0 ‰ (w/v) KH ₂ PO ₄ (sterilfiltriert) 4,0 ‰ (w/v) Na ₂ SO ₄ 8,0 ‰ (w/v) KCl 4,08 ‰ (w/v) MgSO ₄ 1,32 ‰ (w/v) CaCl ₂ 8,0 ‰ (v/v) Spurenelement-Lösung
SCS-Puffer (Protoplastierung)	20 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5,8 1 M Sorbitol
SCS-Novozym-Lösung (Protoplastierung)	0,5 % (w/v) Novozym 234 (sterilfiltriert, frisch angesetzt) in SCS-Lösung
STET-Puffer	50 mM EDTA

Bezeichnung	Zusammensetzung
	50 mM Tris/HCl pH8 8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X 100 2 M Essigsäure
Southern-Denaturierungslösung	0,25 M HCl
Southern-Transferlösung	0,4 M NaOH
Southern-Hybridisierungspuffer	7 % (w/v) SDS 500 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Southern-Waschpuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Spurenelement-Lösung (sterilfiltriert)	0,06 ‰ (w/v) H ₃ BO ₃ 0,14 ‰ (w/v) MnCl 0,4 ‰ (w/v) ZnCl ₂ 0,4 ‰ (w/v) Na ₂ MoO ₄ 0,1 ‰ (w/v) FeCl ₃ 0,04 ‰ (w/v) CuSO ₄
STC-Puffer (Protoplastierung)	1 M Sorbitol 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 100 mM CaCl ₂
STC/PEG (Transformation U. maydis)	60 % (v/v) STC-Puffer 40 % (w/v) Polyethylenglykol
TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,3 20 mM Na-Acetat 2 mM Na ₂ -EDTA
10x Taq-Puffer	500 mM DMSO 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 10 x TBS 100 mM Tris (pH 8,0) 1,5 M NaCl
1 x TBS	10 % 10 x TBS
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Na ₂ -EDTA
TE mit RNaseA	50 µg/ml RNaseA in TE-Puffer
Transfer-Puffer	25 mM Tris/HCl-Puffer pH 8.3

Bezeichnung	Zusammensetzung
	192 mM Glycine 20% v/v Methanol
Vitaminlösung nach Holliday	0,1 ‰ (w/v) Thiamin 0,05 ‰ (w/v) Riboflavin 0,05 ‰ (w/v) Pyridoxin 0,2 ‰ (w/v) Ca-Pantothenat 0,05 ‰ (w/v) Aminobenzoesäure 0,2 ‰ (w/v) Nicotinsäure 0,2 ‰ (w/v) Cholinchlorid 1,0 ‰ (w/v) myo-Inositol
X-Gal-Lösung	2,0 ‰ (w/v) X-Gal in N, N-Dimethylformamid

7.1.6 Größenstandards

Als Größenstandards dienen mit *Pst*I oder *Bst*EII verdauete λ -DNA oder die 2-log und 1 kb-Leiter (New England Biolabs).

7.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Generierung von Deletionskonstrukten

Deletions-konstrukt (Flanke)	Primer-name	Restriktions-stelle	Sequenz in 5'-3' Richtung
Δ sir1 ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹ (linke Flanke)	oKZ50	SfiI	ATCTAGGCCCCACGTGGCCATGCTCAGGCTGCTCACAAG
	oKZ51	SfiI	ATACTGGCCATCTAGGCCGGATTGGGCGAGCACATGAC
Δ sir1 ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹ (rechte Flanke)	oJS302	SfiI	ACTATGGCCTGAGTGGCCGTGCATCTTCGGCATGATCG
	oJS303	SfiI	ATATAGGCCCCACGTGGCCATGGATGGCACGTTGATCG
Δ sir1 ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹	oKZ52		AGGTTCTCCACGCACTGATG
	oJS305		GTTGCCCAAAGAAGTGGAACG
Δ tam1 (linke Flanke)	oJS368	SfiI	ATAATGGCCACGTGGGCCAGCCGAAAGTCGAATAAGC
	oJS369	SfiI	ATAATGGCCTGAGTGGCCGTTTGACAGGGAGGATATTGG
Δ tam1 (rechte Flanke)	oJS370	SfiI	ATCTAGGCCATCTAGGCCTGAGCTCGCTTAAATGG
	oJS371	SfiI	ATAATGGCCACGTGGGCCGATTCATACTCGCGGAACC
Δ tam1	oJS372		CCGAATTGTGCCGGATTGC
	oJS373		CCGAATTGTGCCGGATTGC

Tabelle 3: Oligonukleotide für Tam1-Überexpressionskonstrukt

Konstrukt	Primer-name	Restriktions-stelle	Sequenz in 5'-3'-Richtung
Tam1-OEx	oKZ121	NdeI	GGTACATATGACACCTTCCGCCCAAG
	oKZ122	XhoI	GGTTCTCGAGTTAAGCGAGCTCAGG

Tabelle 4: Oligonukleotide für *U. maydis*-Komplementationskonstrukte. PCR-Produkte wurden jeweils in p123 (geschnitten mit NdeI und NotI) kloniert

Konstrukt	Primer-name	Restriktions-stelle	Sequenz in 5'-3'-Richtung
<i>sr13864</i> ohne GFP im Cbx-Locus (<i>U. maydis</i>)	oKZ342	NdeI	CTAGCATATGCCGTCAAATGCGAAATTTCC
	oKZ343	NotI	CGCTGCGGCCGCTCAAACTGGAAAGCCAGCTG
<i>um00823</i> ohne GFP im Cbx-Locus (<i>U. maydis</i>)	oKZ345	NdeI	CATATGTACGCCAACGCTTTGCTGTCTTCC
	oKZ344	NotI	CGCTGCGGCCGCTCAAAATTGGAAAGCAAGCTGGCCC

Tabelle 5: Oligonukleotide für *S. reilianum*-Komplementationskonstrukte. Das PCR-Produkt wurde in pNEB-Sr-Cbx (geschnitten mit AscI und PacI) kloniert.

Konstrukt	Primer-name	Restriktions-stelle	Sequenz in 5'-3'-Richtung
<i>sr13864</i> ohne GFP im Cbx-Locus (<i>S. reilianum</i>)	oKZ328	AscI	ACATCGGCGCGCCCCTCTGCAGTCAAACATTCC
	oKZ329	PacI	GTCGCTTAATTAACCGTCAAATGCGAAATTTCC

Tabelle 6: Oligonukleotide für die RT-PCR

Primernamen	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Genname
okz150	TCGGCCGTCTACTGTTACACC	sr13864 – fwd. Primer
okz151	GAAGCTGTCGCCGAAGTGC	sr13864 – rev. Primer
okz166	CGCGCTCTACATCAGATCCG	sr10807 – fwd. Primer
okz167	CGAGCAACATGCCGTTTCCG	sr10807 – rev. Primer
oSP013	CCTCACTAAGCCGGTCATGG	sr16560 – fwd. Primer
oSP014	CCTTCGGCAGACTTCAGTCC	sr16560 – rev. Primer
okz252	CAGATGCGCCAGCATTACACC	sr15796 – fwd. Primer
okz253	CGTCGCCTTCCTCATGTTCC	sr15796 – fwd. Primer
oCH32	CCGAAACTTCAACGAGACC	sr15912 – fwd. Primer
oCH31	CGTGAAGGGCGAGATGAGAAGG	sr15912 – fwd. Primer

7.1.8 Plasmide und Konstrukte

Plasmide

p123 (C. Aichinger)

Dieses Plasmid diente der Generierung von GFP-Fusionsproteinen. Das Plasmid kann in den Cbx-Lokus von *U. maydis* integriert werden und vermittelt dort Resistenz gegenüber Carboxin. Zur selektiven Amplifikation in *E. coli* enthält das Plasmid weiterhin eine Ampicillinresistenz. Der otef-Promoter wurde in den hier bearbeiteten Projekten immer durch andere Promotoren ausgetauscht. Um zu überprüfen, ob eine eventuelle Nicht-Funktionalität durch die Fusion mit GFP verursacht war, wurden zunächst Kontroll-Konstrukte hergestellt, die GFP nicht enthielten.

p123-sr13864 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid diente zur Komplementation des Stamms SG200 Δ um00823.

Das Gen *sr13864* mit seinem nativen Promoter wurde mit den Primern oKZ342 und oKZ343 amplifiziert. Das 2,9-kb-Produkt wurde mit *nde1* und *not1* geschnitten und in die gleichen Restriktionsstellen des Plasmids p123 ligiert. Für die Transformation in SG200 Δ um00823-Protoplasten wurde das Plasmid vorher mit *Age1* geschnitten.

p123-um00823 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid diente zur Komplementation des Stamms SG200 Δ um00823.

Das Gen *um00823* mit seinem nativen Promoter wurde mit den Primern oKZ344 und oKZ345 amplifiziert. Das 2,0-kb-Produkt wurde mit *nde1* und *not1* geschnitten und in die gleichen Restriktionsstellen des Plasmids p123 ligiert. Für die Transformation in SG200 Δ um00823-Protoplasten wurde das Plasmid vorher mit *Ssp1* geschnitten.

pNEB-Sr-Cbx (M. Wagenknecht)

Dieses p123-Derivat enthält eine für *S. reilianum* optimierte Cbx-Integrations-Stelle. Auch dieses Plasmid dient zur Generierung von GFP-Fusionsproteinen, wobei das für GFP-kodierende Gen wahlweise herausgeschnitten werden kann. Es liegt eine Cbx-Resistenz zur Selektion in *S. reilianum* und eine Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* vor.

pNEB-Sr-Cbx-sr13864 (diese Arbeit)

Das Gen *sr13864* mit seinem nativen Promoter wurde mit den Primern oKZ328 und oKZ329 amplifiziert und mit *Asc1* und *Pac1* geschnitten. Das 3,5-kb-Produkt wurde in die gleichen Restriktionsstellen des Vektors pNEB-Sr-Cbx ligiert.

pBS-Cbx (Brachmann et al., 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält den offenen Leserahmen für die Carboxin-resistente Succinatdehydrogenase unter Kontrolle des nativen cbx-Promotors. Die Resistenzkassette (1,9 kb) kann durch *SfiI* aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *SfiI*-Schnittstellen in ihrer Sequenz.

pBS-Hyg (Brachmann et al., 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette unter Kontrolle des konstitutiven hsp70-Promotors aus *U. maydis*. Die Resistenzkassette (2,7 kb) kann durch *SfiI* aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden *SfiI*-Schnittstellen. Da der hsp70-Terminator in diesem Plasmid leichte Promotoraktivität zeigen kann, wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit das Plasmid pBS-hhn verwendet.

pBS-hhn (Laborsammlung)

Dieses pBS-Hyg-Derivat enthält einen verkürzten nos-Terminator. Die Resistenzkassette (1,8 kb) kann durch SfiI aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden SfiI-Schnittstellen.

pBS-Phleo (Brachmann et al., 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine Phleomycin-Resistenzkassette unter Kontrolle des konstitutiven hsp70-Promotors. Die Resistenzkassette (2,2 kb) kann durch SfiI aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden SfiI-Schnittstellen.

pET15b (Novagen, Madison, WI, USA)

Dieses pBR322-Derivat besitzt ein N-terminales 6fach His-Tag, eine Thrombin-Schnittstelle und eine Multiple Cloning Site. Es trägt außerdem eine Ampicillinresistenz.

pET15b-Tam1 (diese Arbeit)

Der Tam1-ORF wurde mit den Primern oKZ121 und oKZ122 von genomischer DNA des *U. maydis* Wildtyp-Stammes 521 amplifiziert. Das 1,5-kb-Produkt wurde mit NdeI und XhoI geschnitten und in die gleichen Restriktionsschnittstellen des Vektors pET15b ligiert.

pTC-Nat (Brachmann et al., 2004)

Dieses pBS(+)-KSII-Derivat enthält eine Nourseothricin-Resistenzkassette unter Kontrolle des konstitutiven Promotors der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *U. maydis*. Die Resistenzkassette (1,4 kb) kann durch SfiI aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dabei unterscheiden sich die beiden SfiI-Schnittstellen.

pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

Dieser Vektor enthält einen einzelsträngigen T-Überhang, in den durch die assoziierte Topoisomerase PCR-Produkte mit A-Überhang eingefügt werden können.

Konstrukte***sir1*-Partial-Deletionskonstrukt (diese Arbeit)**

In Anlehnung an die Lokalisation der zwei unterschiedlichen Punktmutationen in WW02 und WW03 wurde eine Stelle zwischen den davon abgeleiteten neu generierten Stopcodons für die Primerherstellung für ein Deletionskonstrukt der C-terminalen Domäne gewählt. Die 5'- und 3'-flankierende Regionen wurden mit den Primer-Kombinationen oKZ50/oKZ51 und oJS302/oS303 hergestellt, dann mit SfiI geschnitten und mit der 2,4kb-SfiI-geschnittenen Hygromycin-Kassette aus dem Plasmid pBS-Hyg ligiert. Das gesamte Deletionskonstrukt wurde mit den „nested“ Primern oKZ52 und oJS305 amplifiziert.

***tam1*-Deletionskonstrukt (diese Arbeit)**

Die 5'- und 3'-flankierenden Regionen von *tam1* wurden mit den Primerkombinationen oJS368 und oJS396 sowie oJS370 und oJS371 generiert. Die Flanken wurden mit SfiI geschnitten und mit den SfiI-Überhängen der Carboxin-Resistenz-Kassette (aus pBS-Cbx) zusammenligiert. Das gesamte Deletionskonstrukt wurde mit den „nested primers“ oJS372 und oJS373 amplifiziert.

***tam2*-Deletionskonstrukt (Reineke et al., 2008, C. Basse)**

Die 5'- und 3'-flankierenden Regionen von *tam2* wurden mit den Primer-Kombinationen oTam1 (GCTCGTCTGGGGTACCATGCAAG)/

oTam2 (CACGGCCTGAGTGGCCTGGCGATGTGGCCGAGGACATC) und oTam3 (GTGGGCCATCTAGGCCGGCTCCAGATTCTGCCTAG)/
oTam4 (CATGTCAACAGACCCAGCTGC) generiert, mit der 2,4kb SfiI geschnittenen Phleomycin-Resistenz-Kassette von pBS-Phleo zusammenligiert und in pCRZeroBlunt (Invitrogen) kloniert. Das Tam2-Deletionskonstrukt wurde aus phle8 amplifiziert, wobei die „nested“ Primer oTam1ne (GACTCGGGGCACTCTCCAAGTC) und oTam4ne (GAGAGCATCACTCAGCTCTCG) eingesetzt wurden.

7.1.9 *E.coli*-Stämme

Für routinemäßige Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 handelt. Genotyp TOP10: F- mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG.

Um Gene heterolog überzuexprimieren, wurde der Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS von Merck Biosciences (Darmstadt) mit dem Genotyp F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE (CmR) verwendet.

7.1.10 *U. maydis* Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangs-stamm	Resistenz	Referenz
521	<i>a1b1</i>	521		
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	SG100	Phleo ^R	Kämper et al., 2006
521sir1 Δ ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹	<i>a1b1um02922Δ¹⁰⁵⁴⁻¹⁴⁹⁹</i>	521	Hyg ^R	diese Arbeit
WW02	<i>a1b1um02922-nt3497-Mut</i>	521		Wenying Wu
WW01, WW03	<i>a1b1um02922-nt3113-Mut</i>	521		Wenying Wu
521 Δ am1	<i>a1b1Δum01804</i>	521	Phleo ^R	diese Arbeit
521 Δ am2	<i>a1b1Δum03538</i>	521	Cbx ^R	Reineke et al., 2008/ Zuther et al., 2008
SG200 Δ um00823#9	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00823#9</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	Stephan Poppe
SG200 Δ um00823#14	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00823#9</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	Stephan Poppe
SG200 Δ um00823#1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00823#9</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	Stephan Poppe
SG200 Δ um00823#6	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00823#9</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	Stephan Poppe
SG200 Δ um00823#16	<i>a1 mfa2 bE1</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	Stephan Poppe

	<i>bW2 Δum00823#9</i>			
SG200Δum00823#9 +um00823#1Kompl.	<i>a1 mfa2 bE1</i> <i>bW2 Δum00823#9+um00823^{ip}</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	diese Arbeit
SG200Δum00823#9 +um00823#5Kompl.	<i>a1 mfa2 bE1</i> <i>bW2 Δum00823#9+um00823^{ip}</i>	SG200	Phleo ^R Hyg ^R	diese Arbeit
SG200Δum00823#9 +sr13864#3Kompl.	<i>a1 mfa2 bE1</i> <i>bW2 Δum00823#9+sr13864^{ip}</i>	SG200 Δum00823#9	Phleo ^R Hyg ^R Cbx ^R	diese Arbeit
SG200Δum00823#9 +sr13864#2Kompl.	<i>a1 mfa2 bE1</i> <i>bW2 Δum00823#9+sr13864^{ip*}</i>	SG200 Δum00823#9	Phleo ^R Hyg ^R Cbx ^R	diese Arbeit

7.1.11 *S. reilianum*-Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangs- stamm	Resistenz	Referenz
5-1 (SRM)	<i>a2b2</i>			Schirawski et al., 2006
5-2 (SRM)	<i>a1b1</i>			Schirawski et al., 2005
H2-7 (SRH)	<i>a2b6</i>			diese Arbeit
H2-8 (SRH)	<i>a1b1 Δum00823#9+sr13864^{ip*}</i>			diese Arbeit
H2-7-sr13864 (SRH)	<i>a1b1+sr13864^{ip}</i>	H2-7	Cbx	diese Arbeit
H2-8-sr13864 (SRH)	<i>a1b1+ sr13864^{ip}</i>	H2-8	Cbx	diese Arbeit
H2-8-sr13864 (SRH)	<i>a1b1+ sr13864_ekt.</i>	H2-8	Cbx	diese Arbeit

7.1.12 Maisvarietäten (*Zea mays*, spec.)

Für die Pflanzeninfektionen mit *U. maydis*-Derivaten wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet, wenn nicht anders angegeben. Für die Pflanzeninfektionen mit *S. reilianum*-Derivaten wurde die Maisvarietät Gaspe Flint verwendet.

7.1.13 Hirsevarietäten

Für die Infektion von *S. reilianum* auf Hirse wurde die Hirsevarietät Sorghum bicolor (L.) Moench s.l. "Tall Polish" eingesetzt. Sie wurden vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben zur Verfügung gestellt.

7.1.14 Zelllinie

Die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde freundlicherweise von Prof. August Bernd vom Institut für Dermatologie (Universitätsklinikum Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Diese spontan transformierte, epitheliale Zelllinie, die in Kultur ihr Proliferationspotential und ihre biochemische Leistungsfähigkeit weitgehend behält, verfügt im Gegensatz zu anderen immortalisierten Zelllinien über annähernd gleiche Differenzierungseigenschaften wie humane Keratinozyten. Sie entstammt der Peripherie eines primären malignen Melanoms der oberen Rückenhaut eines 62jährigen Patienten und konnte Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg von der Arbeitsgruppe Fusenig et al. etabliert werden.

7.1.15 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
dYT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl
dYT-Agar	wie dYT-Medium 1,3 % (w/v) Agar

7.1.16 Medien zur Kultivierung von *U. maydis*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
Complete Medium (CM)	0,25 % (w/v) Casaminoacids 0,1 % (w/v) Yeast-Extract 1,0 % (v/v) Vitaminlösung nach Holliday 0,05 % (w/v) DNA degr. Free Acid 6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holliday 0,15 % (w/v) Ammoniumnitrat 1,0 % (w/v) Glukose
NSY-Glycerin-Medium	8 g/l Nutrient Broth 5 g/l Saccharose 1 g/l Hefe-Extrakt 69,6 % (v/v) Glycerin
PD-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 2,0 % (w/v) Agar
PD-Charcoal-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 10 g/l Charcoal 2,0 % (w/v) Agar

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
Regenerations-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose bzw. Glukose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar
YEPS-Medium	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose
Wasseragar	2,0 % (w/v) Agar

7.1.17 Medien zur Kultivierung von *S. reilianum*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
PD-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 2,0 % (w/v) Agar
PD-Flüssig-Medium	24 g/l Potato Dextrose Broth
Regenerations-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose bzw. Glukose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Aga
YEPS-Medium	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose
Wasseragar	2,0 % (w/v) Agar

7.1.18 Medien zur Kultivierung von *M. furfur*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
<i>M. furfur</i> -Vollmedium (Agar)	3,6 g Malzextrakt, 0,6 g Pepton, 2 g Ochsen-galle,

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
	2 g Agar
	(pro 100 ml H ₂ O bidest)

Tabelle 7: Medien zur Kultivierung von *M. furfur* (Mayser et al., 1998)

Nach dem Autoklavieren bei 1 bar über 30 min (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin, FRG) und abkühlen auf etwa 50°C wurden 2,5 ml Tween 40 sowie 1,0 ml Olivenöl hinzugegeben.

7.1.19 Medien zur Kultivierung von HaCaT-Zellen

Dulbecco's Minimum Essential Medium:	DMEM mit "high Glucose" mit Natriumcarbonat; Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum: FCS,	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin;	Biochrom, Berlin
Trypsin (0,25%)/EDTA(0,02%)-Lösung:	Biochrom, Berlin
PBS: phosphat buffered saline;	Biochrom, Berlin

Einfriermedium (mit 10 % DMSO);	DMEM mit 10 % DMSO
---------------------------------	--------------------

RPMI-Medium,	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
--------------	---------------------------------

Für das Zählen der Zellen als Marker für die Vitalität:

Trypanblau-Lösung: Trypan Blue 0,5%;	PAA Laboratories GmbH
--------------------------------------	-----------------------

7.2 Methoden

7.2.1 Anzucht von Mikroorganismen

7.2.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen angezogen. Dem Medium wurde, wenn nötig, Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Zur Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, wenn nötig mit oben genannter Konzentration an Ampicillin. Zum Nachweis von β-Galaktosidase-Aktivität im Blau-Weiß-Test wurde X-Gal mit einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) zugegeben.

Bei der Anzuchttemperatur wurde für Über-Nacht-Kulturen (ÜNKs) 37°C gewählt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ÜNKs mit dYT-Glycerin-Medium in Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C eingefroren.

7.2.1.2 Anzucht von *U. maydis*

Flüssigkulturen von *U. maydis* wurden meist auf YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin (200 µg/ml Endkonzentration), Carboxin (2 µg/ml Endkonzentration) oder Nourseothricin (150 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Zugabe

der sterilfiltrierten Antibiotika (ABs) erfolgte nach dem Autoklavieren. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht oder bis zu mehreren Tagen bei 28°C.

Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf CM-Glucose-Agar, PD-Agar oder Regenerationsagar, falls erforderlich mit oben genannten AB-Konzentrationen. Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

7.2.1.3 Anzucht von *S. reilianum*

Flüssigkulturen von *S. reilianum* wurden meist auf YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin (200 µg/ml Endkonzentration), Carboxin (2 µg/ml Endkonzentration) oder Nourseothricin (150 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Für die Anzucht von *S. reilianum* zur Pflanzeninfektion wurden die Kulturen in PD-Medium angezogen. Die Zugabe der sterilfiltrierten Antibiotika (ABs) erfolgte nach dem Autoklavieren. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht oder bis zu mehreren Tagen bei 28°C.

Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf PD-Agar oder Regenerationsagar, falls erforderlich mit oben genannten AB-Konzentrationen. Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

7.2.1.4 Anzucht von *M. furfur* (P. Mayser et al., 1998)

Die Anzucht des Stammes erfolgte auf modifiziertem (m) Dixon-Agar (Guého 1996, Guillot 1997) in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 32°C. Etwa wöchentlich wurden die Kulturen auf frischen Nährboden weiterverimpft.

7.2.2 Kultivierung von HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden im Brutschrank unter 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Die Kultivierung der adherenten HaCat-Zellen erfolgte in 20 ml Medium in sterilen Zellkulturgefäßen (250 ml).

7.2.2.1 Passagieren der Zellen

Im ersten Schritt wurde einmal mit Dulbecco-PBS gewaschen und anschließend Trypsin-EDTA-Lösung (2.5 ml) zugegeben. Es wurde so lange inkubiert (5-10 min), bis im Lichtmikroskop eine deutliche Abkuglung der Einzelzellen beobachtet werden konnte. Nach vollständiger Entfernung der Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und nach Zugabe von frischem Medium (20 ml) durch mehrfaches Pipettieren suspendiert und vereinzelt. Die suspendierten Zellen wurden in einer 1:10-Verdünnung ausgesät. Im Falle der Aussaat einer definierten Anzahl Zellen wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf die erforderliche Zellkonzentration eingestellt.

7.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eine Konservierung von Kulturzellen kann durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C erfolgen. So eingefrorene Zellen sind jahrelang haltbar und nach Bedarf jederzeit wieder auftau- und kultivierbar. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Gewebekulturplatte (Durchmesser 100 mm, ca. 5 x 10⁶ Zellen) abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation (200 x g, 7 min) wurden die Zellen anschließend pelletiert und in 1.0 ml Einfriermedium (Medium, 10 % (v/v) FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen

überführt und innerhalb von 2 Tagen im Nalgene Cryo Freezing Container in Isopropanol kontinuierlich auf -80°C abgekühlt. Für eine längere Lagerzeit wurde flüssiger Stickstoff verwendet. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad. Schrittweise wurden sie in Medium (8 ml, 4°C) resuspendiert. Nach schonender Zentrifugation ($200 \times g$, 7 min) wurden die Zellen erneut in Medium resuspendiert. Zum vollständigen Auswaschen des aus dem Einfriermedium stammenden DMSO wurde dieser Vorgang erneut wiederholt und konnte zur ersten Passage mit Medium, dem 20 % FCS zugesetzt wurde, kultiviert werden.

7.2.3 DNA-Präparationen

7.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - analytischer Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode der kochenden Lyse durchgeführt. In einigen Fällen wurde auch das pGOLD Plasmid Mini Prep Kit I oder das QIAGEN-Miniprep-Kit nach Herstellerangaben verwendet.

Kochende Lyse

Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und der Niederschlag nach Entfernen des Überstandes in 350 µl Stet-Puffer und 25 µl Lysozym 5 min schüttelnd inkubiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf Heizblock inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 40 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 400 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, 5 min getrocknet, in 30 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA aufgenommen und 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst.

7.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - präparativer Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Jetstar Maxi-Kit der Firma Genomed oder dem QIAGEN-Maxiprep-Kit nach Herstellerangaben.

7.2.3.3 Präparation DNA aus *U. maydis* für PCR

Eine Kultur von *U. maydis* wurde bis zu einer OD600 von 0,3 - 0,4 auf YEPS angezogen und 2 ml davon wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Tischzentrifuge). Das Sediment wurde in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und anschließend mit 0,3 g Glasperlen (425-600 Micron) und 500 µl Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer geschüttelt (10 min, RT) und nachfolgend zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). 450 µl des Überstandes wurden mit 315 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde das Sediment in 50 µl TE mit RNaseA aufgenommen, 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

7.2.3.4 Präparation von DNA aus *U. maydis* für Southern Blot

15 ml einer Übernachtskultur von *U. maydis* wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (4300 rpm, 15 min, 4°C , Heraeus-Zentrifuge). Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (4300 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 200 µl Lysis-Puffer und 0,3g Glasperlen (425-600 Micron) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform wurde 3,5 min gevortext.

Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer zugesetzt. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cup gegeben. Es wurde 1 ml 96

% Ethanol zugegeben, gemischt und abzentrifugiert (4000 rpm, 2 min, 4°C, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde 10 min getrocknet und in 400 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA gelöst. Die Lösung wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion wurden 400 µl Phenol/Chloroform zugegeben und nach Vortexen abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, RT, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 11 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Anschließend wurde 1 ml Ethanol zugegeben und gemischt.

Nach Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde es nach einer 10 minütigen Trocknung bei RT in 50 µl TE resuspendiert. Hierfür wurde es für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

7.2.4 Amplifikation und Klonierung von DNA

7.2.4.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Innis and Gelfand, 1990). Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv angereichert werden. Es werden zwei Primer benötigt, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist.

Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt. Es wurde wahlweise die Taq-Polymerase oder die Phusion-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet.

Reaktions-Ansatz (Taq-Polymerase)

10 % (v/v) Taq-Puffer (10x)
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM dNTPs
je 0,5 µM Primer 1 und Primer 2
0,5 U Taq-Polymerase
10-100 ng DNA-Matrize

PCR-Programm:

10 min, 94°C anfänglicher Denaturierungs-Schritt	x30-35
1 min, 94°C Denaturierung	
1 min, 40-70°C Anlagerung der Primer, Temperatur abhängig vom Primer	
1 min je 1 kb, 72°C Elongation	
10 min, 72°C finale Polymerisation	

PCR-Ansätze mit Phusion-DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (PTC 200, MJ Research).

Bei Verwendung der Phusion-Polymerase fand die Denaturierung bei 98 °C statt. Außerdem wurde die Annealingzeit auf 30 sec/kb und die Elongationszeit auf 15 sec/kb herabgesetzt. Die Wahl der Hybridisierungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer mit DNA gepaart, die andere Hälfte aber ungebunden vorliegt. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C niedriger als die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur gewählt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

7.2.4.2 Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurden die Reaktionen mit einer Endkonzentration von 50 µg/µl RNaseA versetzt.

Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einem Enzym geschnitten und dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 4°C, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol, nochmaligem Zentrifugieren und anschließendem Trocknen wurde das Pellet in wenigen µl H₂O (Braun) gelöst und die DNA mit dem zweiten Enzym geschnitten.

7.2.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung einer Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation wurden die 5'-Enden durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) dephosphoryliert.

Dazu wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl 10 x CIAP-Puffer und 1 µl CIAP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurden der Reaktion 150 µl H₂O und 200 µl Phenol/Chloroform beigelegt. Nach gründlichem Durchmischen der Phasen wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit 2 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol und vollständigem Trocknen wurde die DNA in 10 µl H₂O gelöst. Die Inaktivierung erfolgte durch Inkubation für 15 min bei 65°C. Eine anschließende Fällung war hier nötig.

7.2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder auch mehrerer DNA-Fragmente ist mit T4-DNALigase möglich. Für die Ligation von Fragmenten in ein geöffnetes Plasmid wurden 100 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 U T4-DNA-Ligase und bis zu 7,5 µl Lösung des oder der zu klonierenden Fragmente vermengt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 2-3 h bei RT oder ÜN bei 14°C wurde 1 µl des Ansatzes in elektrokompente oder chemokompente *E. coli*-Zellen transformiert.

7.2.4.5 TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Das TOPO-Cloning Kit nutzt die Ligase-Aktivität der Topoisomerase aus, die sich an den Enden des linearen Vektors befindet. Für die Klonierung von Phusion-generierten PCR-Produkten, deren Enden keinen A-Überhang enthalten, wurde zunächst ein solcher Desoxyadenosin-Überhang an den 3'-Enden eingeführt. Dazu wurden 5 µl des aus einem Agarosegel eluierten Deletionskonstruktes mit 0,2 µl dNTPS, 1 µl Taq-PCR-Puffer (s.u.), 1 µl Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und 10 min bei 72°C inkubiert.

6 µl dieses Ansatzes wurden für die Klonierung in pCR2.1TOPO mit 1 µl des Vektors und 1 µl der mitgelieferten Salzlösung gemischt und für 5 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen. Der Vektor enthält das *lacZ*-Gen, das eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion der Transformanten auf X-Gal-haltigen Platten ermöglicht.

7.2.5 Analyse von DNA

7.2.5.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen. Als Mengen-Referenz diente λ -DNA (10, 30, 60 ng). Nach kurzer Gelelektrophorese konnte die Konzentration anhand der Banden-Intensität im Vergleich zur λ -DNA ermittelt werden.

7.2.5.2 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 0,8 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 $\mu\text{g/ml}$) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt.

Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit PstI vollständig geschnittene λ -DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 25 – 100 V. Da sich das Ethidiumbromid in die DNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet.

7.2.5.3 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) gewählt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA dient hierbei während einer Polymerase-Kettenreaktion als Matrize. Die Didesoxyribonucleotide, die zum Kettenabbruch führen, sind mit verschiedenen Fluoreszenzträgern markiert. Es wurden 5 pmol Primer und ca. 400 ng gelöste DNA je Reaktion eingesetzt. Diese Komponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit 2 μl BigDye Terminator v3.1 Cycle Mix und 3 μl Reaction Buffer versetzt und einer PCR mit folgenden Parametern unterworfen:

1 min, 99°C anfänglicher Denaturierungs-Schritt

10 sec, 96°C Denaturierung

30 sec, 50°C Anlagerung der Primer

4 min, 60°C Elongation

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 10 μl 125 mM EDTA, 9 μl 3 M Natriumacetat, 80 μl Wasser und 400 μl Ethanol (96 %) gefällt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Anschließend wurde zwei mal mit Ethanol (70 %) gewaschen und jeweils für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 μl Formamid- Mix resuspendiert und zur Sequenzierung abgegeben.

7.2.6 Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer und Nachweis von DNA im Southern-Blot (nach Southern, 1975) Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillar-Blot. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung schüttelnd inkubiert, um den Transfer großer DNA-Fragmente zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH gewaschen. Der Transfer erfolgte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran (Roche). Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens 3,5 h. Nach dem Transfer wurden die Taschen des Geles mit Bleistift auf die Membran gezeichnet.

Für die Markierung einer Sonde mit DIG High Prime (Roche) wurden 100 ng des zu markierenden DNA-Fragmentes in einem Volumen von 16 µl für 10 min bei 95°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer) und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl DIG High Prime wurde die Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der Markierungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 und 10 minütige Inkubation bei 65°C (Eppendorf Thermomixer). Die Sonde wurde zu 20 ml auf 65°C vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben.

Für die Markierung einer Sonde mit PCR DIG Labeling Mix (Roche) wurden 50 ng Matrizen-DNA mit 10 µl 10x PCR-Puffer, je 1 µl der beiden Primer, 1 µl Taq-DNA-Polymerase und 5 µl PCR DIG Labeling Mix in einem Gesamtvolumen von 100 µl vermischt. Das PCR-Programm wurde entsprechend der erwarteten Fragmentgröße und der Annealing-Temperatur der Primer gewählt. Nach dem Markieren wurde das DNA-Fragment mit einem PCR Clean up Kit (Qiagen) aufgereinigt, um nicht eingebaute markierte Nukleotide zu entfernen. Die Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer) und zu 20 ml vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben.

Durch halbstündige Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte mindestens über Nacht drehend bei 65°C im Hybridisierungssofen. Danach wurden die Membranen zweimal mit Southern Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen. Nach einem Waschschriff mit DIG-Waschpuffer für 5 min, wurden die Membranen für 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Dann wurden die Membranen für 30 min mit Antikörperlösung geschwenkt. Der Antikörper ist dabei kovalent an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurde zweimal für je 15 min mit DIG Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit DIG3 äquilibriert, um den für die alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Deren Substrat CDP Star (Roche) wurde 1:100 in DIG3 verdünnt und für 5 min zu den Membranen gegeben. Danach wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dadurch konnte die lichtproduzierende Reaktion detektiert werden. Die Membranen wurden in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omat XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 min bis 30 min durch Auflegung des Films auf die eingeschweißte Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

7.2.7 Präparation von RNA

Zur Präparation von RNA wurden ausschließlich autoklavierte Gefäße und Materialien verwendet, alle wässrigen Lösungen waren durch Zugabe von 1/1000 Vol DEPC von RNAsen befreit worden.

Zur Präparation wurden 15 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von ca. 500 abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Nach Entfernung des Mediums wurde das Pellet in 400 ml AE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 40 µl 10 % SDS zugegeben, gevortext und direkt anschließend 400 µl 65°C warmes mit AE-Puffer gesättigtes Phenol zugegeben, gevortext und 10 min schüttelnd auf 65°C Eppendortheizblock inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei –80°C und eine anschließende Zentrifugation (2 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Die RNA wurde zum weiteren Reinigen mit 400 µl Phenol/Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zuführen von 1/10 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Vol 98 % Ethanol, Vortexen und Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge) gefällt. Die RNA wurde nun mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl TE mit 1 % Proteinase K aufgenommen. Die präparierte RNA wurde direkt für weitere Analyse eingesetzt oder bei –80°C gelagert.

7.2.8 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Invitrogen-SuperScriptIII-Kit durchgeführt und den Angaben des Herstellers gefolgt. Es wurden 1 ng bis 1 µg Total-RNA eingesetzt.

„SuperScript III Reverse Transcriptase“ ist ein Derivat der M-MLV-RT, welches hergestellt wurde, um RNase H-Aktivität zu reduzieren und um gesteigerte Wärmestabilität zu gewährleisten. Das Enzym wurde benutzt, um cDNA bei einer Temperatur von 42-55°C zu synthetisieren, wobei erhöhte Spezifität, hohe Mengen an cDNA und große Mengen an Voll-Längen-Produkt erzielt wurden. Die cDNA-Synthese wurde im vorliegenden Fall zur Erststrangsynthese durch Total-RNA mit Oligo (dT)-Primern durchgeführt. In der Zweitstrangsynthese wurde die PCR mit Primern durchgeführt, die für das Zielgen spezifisch sind.

7.2.9 Transformationen

7.2.9.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* wurden 2 ml einer ÜNK des Stammes TOP10 auf 200 ml dYT-Medium überimpft und in einem Schikane-Kolben bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde nacheinander mit 200 ml und 50 ml sterilem H₂O sowie 5 ml und 2,5 ml 10 % Glycerin gewaschen und jeweils wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in Reaktionsgefäßen auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

7.2.9.2 Elektro-Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur effizienten Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in *E. coli* wurde häufig die Methode der Elektroporation gewählt. Hierbei wurden 50 µl elektro-kompetente *E. coli* mit 1 µl des Ligations-Ansatzes versetzt und 1 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern konnte. Anschließend wurde das Gemisch in eine Elektroporations-Küvette überführt und bei 125 µF, 200 Ω und 2,5 kV elektroporiert (Gene Pulser, Fa. Biorad, München). Es wurde darauf geachtet, dass der ausgegebene Wert für τ bei 4,5 bis 4,7 ms lag.

Die Zellen wurden in 1 ml 37°C warmem dYT-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. 50 bis 500 µl der Zellsuspension wurden auf dYT-Agar mit Ampicillin, falls nötig mit X-Gal, ausplattiert.

7.2.9.3 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml dYT-Medium mit 2 ml Übernachtskultur des Stammes TOP10 versetzt und in einem Schikanekolben bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Die Kultur wurde bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml 50 mM CaCl₂ auf Eis resuspendiert und erneut mit den gleichen Einstellungen für 10 min zentrifugiert. Dann wurde es in 5 ml 50 mM CaCl₂, 10 % Glycerin resuspendiert. Je 100 µl wurden in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und dann bei -80°C eingefroren.

7.2.9.4 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl chemokompetenten Zellen versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C gebracht und anschließend sofort mit 800 µl dYT-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm. Anschließend wurden zwischen 100 und 200 µl des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

7.2.9.5 Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis* - Protoplasten wurden eine Kultur in 50 ml YEPS-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 gezogen. Diese wurde zentrifugiert (3200 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Zellsediment in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Pellet mit 2 ml SCSNovozym- Lösung versetzt. Der Ansatz wurde bei 28°C inkubiert, bis ca. 80 % der Zellen als runde Protoplasten vorlagen (ca. 10 bis 45 min). Die Protoplastierung wurde durch Zugabe von 10 ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde vorsichtig nacheinander mit zweimal 10 ml SCS-Lösung und 10 ml STC-Lösung gewaschen und jeweils wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 500 µl STC-Lösung aufgenommen, auf 50 µl aliquotiert und im auf -80°C gelagert.

7.2.9.6 Transformation von *U. maydis*-Protoplasten

Zur Transformation von *U. maydis* wurden zu 50 µl Protoplasten-Suspension 500 ng bis 5 µg lineare oder Plasmid-DNA gegeben. Ebenso wurde jeweils eine Kontrolle mit gleichem Volumen an H₂O versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl eiskalter STC/PEG-Lösung vermennt. Durch die Zugabe von PEG werden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel und diese kann in die Protoplasten aufgenommen werden. Die Gemische wurden weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf Regenerations-Agar ausplattiert und unter der Sterilbank für ca. 20 min getrocknet. Die Platten enthielten als untere Schicht 10 ml Regenerations-Agar mit einer zweifachen Antibiotika-Konzentration (Hygromycin: 400 µg/ml, Carboxin 4 µg/ml, Nourseothricin: 300 µg/ml) und darüber 10 ml Regenerations-Agar ohne Antibiotikum (AB). So stellt sich in Folge der Diffusion auf der Oberfläche des Agars mit der Zeit die übliche Konzentration an AB ein, so dass vorher die Resistenz in den transformierten Protoplasten zur Ausprägung kommen kann. Die Platten wurden bei 28°C für zwei bis fünf Tage inkubiert und gebildete Kolonien auf PD-Agar mit AB vereinzelt.

7.2.9.7 Integration von Vektoren in den genomischen ip-Locus

Der häufig zur Integration von Vektorkonstrukten genutzte cbx-Lokus wird so genannt, da er Carboxinresistenz (CbxR) nach Integration spezieller Vektoren vermittelt. Der cbx-Lokus wird auch ip-Locus genannt. Diese speziellen Vektoren tragen ein Carboxinresistenz vermittelndes Allel des ip-Gens. Carboxin ist ein Fungizid, das die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase inhibiert. Das vektorkodierte IP-Protein wird nicht durch das Fungizid inhibiert und vermittelt dadurch die Carboxinresistenz. Der Vektor kann durch SspI in dem ip-Allel linearisiert werden und nach der Transformation durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen ip-Lokus integrieren. Der ip-Lokus wird durch die Integration des Vektors verdoppelt.

7.2.10 Proteinbiochemische Methoden

7.2.10.1 Präparation und Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein aus Zelllinien

Zum Protease-Schutz wurde eine „Complete, Mini, EDTA-free“-Tablette (Roche Diagnostics, Penzberg) mit 20 µg/ml Pancreasextrakt, 2 µg/ml Chymotrypsin, 0,5 µg/ml Thermolysin, 20 µg/ml Trypsin und 330 µg/ml Papain im RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) aufgelöst.

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden diese als Zellaufschluss mittels RIPA-Puffer komplett aufgetragen. Zu diesem Zweck wurden die Lysate zunächst auf Eis homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4 °C), um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und diese erneut für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C gelagert oder direkt in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von (Bradford, 1976)) mit Hilfe des Roti®-Nanoquant Protein Assays (Firma ROTH, Karlsruhe) bestimmt. Der im Protein-Assay enthaltene Farbstoff ändert sein Absorptionsverhalten bei 595 nm linear zur Proteinkonzentration im Reaktionsansatz. Durch Mitführen einer BSA-Eichreihe (BSA Fraktion V) (0/ 1,0/ 1,5/ 2,0/ 2,5/ 3,0/ 4,0/ 5,0 mg BSA) bei jeder Messung kann die Proteinkonzentration aus der Eichgeraden interpoliert werden. Das zu messende Zelllysate wurde verdünnt (1:500 und 1:1000) und 50 µl der Verdünnung in eine flachbödige 96-Loch-Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) pipettiert. Ebenso wurde mit der BSA-Eichreihe verfahren. Der Roti®-Nanoquant - Farbstoff wurde 1:1,75 (z.B. 2 ml Roti®-Nanoquant + 3,5 ml H₂O) mit H₂O verdünnt und jeweils 200 µl mit der Proteinlösung vermischt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach mindestens 5 min Inkubation bei Raumtemperatur in einem „Tecan Saphir Plate Reader“ bei 595 nm. Es wurden je Probe zwei Messungen durchgeführt und die Werte gemittelt.

7.2.10.2 Präparation und Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus *E.coli*

s. Tam1-Überexpression und Aufreinigung

7.2.10.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Die Gele bestanden aus Trnn- und Sammelgel und wurden nach den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien präpariert. Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei der konstanten

Spannung von 120 V (Sammelgel) bzw. 180 V (Trenngel). Als Größenstandard diente der „Prestained-Molecular-Weight-Standard“ der Firma Fermentas.

7.2.11 Untersuchung von *U. maydis* und *S. reilianum*

7.2.11.1 Infektion von Maispflanzen und Isolierung haploider Nachkommen

Zur Erzeugung von haploiden Nachkommen und zum Test der Pathogenität von *U. maydis* – und *S. reilianum*-Stämmen wurden im Gewächshaus angezogene, 7 Tage alte Maispflanzen des Typs Early Golden Bantam im Fall von *U. maydis* und des Typs Gaspe Flint im Fall von *S. reilianum* infiziert. Hierzu wurden 50 ml ÜNK auf YEPS-Medium abzentrifugiert (2500 rpm, 10 min, RT, Laborzentrifuge), mit 50 ml Wasser gewaschen und das Pellet in Wasser resuspendiert, dass sich eine OD von 2 ergab. Dann wurde eine 1:1-Mischung kompetenter Kreuzungspartner hergestellt und je etwa 200 µl durch eine Spritze in den Stängel der Pflanzen injiziert. Die Pflanzen konnten nach 7-14 Tagen im Fall von *U. maydis* auf Chlorose, Anthocyan- und Tumorbildung und im Fall von *S. reilianum* auf blattartige Strukturen und Sori im Bereich der Kolben untersucht werden. Zur Kontrolle der Pathogenität wurden die Experimente aus statistischen Gründen an mehreren Pflanzen durchgeführt. Nach der Bildung von Tumoren an den infizierten Maispflanzen konnten daraus Sporen geerntet und auf YEPS-Agar ausplattiert werden. Nach 2-4 tägiger Inkubation bei 28°C wurden Mikrokolonien gepickt und auf YEPS-Festmedium weiter vereinzelt.

7.2.11.2 Infektion von Hirsepflanzen

Um Gene zu analysieren, die eine Rolle in der Wirtsspezifität von *S. reilianum* spielen könnten, wurde Hirse mit beiden *S. reilianum*-Varietäten inokuliert. Die ÜNK erfolgte in 50 ml PD-Medium und wurde mit 2500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit Wasser resuspendiert, so dass sich eine OD von 2 ergab. 14-Tage alte Hirse-Pflanzen wurden mittels Nadelinjektion inokuliert, so dass das innerste Blatt infiziert wurde. Die Pflanzen wurden 3-4 Monate im Gewächshaus wachsen gelassen.

7.2.11.3 Test des Kreuzungsverhaltens auf PD-Charcoal-Agar

Um die Zellfusion und die anschließende Filamentbildung von kompatiblen Kreuzungspartnern zu untersuchen, können Mischungen verschiedener *U. maydis*-Stämme auf Charcoal-PD-Agar angezogen werden. Bei Kombination zweier kompatibler Kreuzungspartner kann der Übergang zum filamentösen Wachstum in Form eines weißen Mycels beobachtet werden (Day and Anagnostakis, 1971). Nicht kompatible Kreuzungspartner wachsen weiter hefeartig und bilden so Kolonien mit glatter Oberfläche aus. Zur Identifikation des Kreuzungsverhaltens eines *U. maydis*-Stammes wurde eine ÜNK dieses Stammes mit der eines kompatiblen Kreuzungspartners im Verhältnis 1:1 gemischt und 5-10 µl jeder Kombination auf Charcoal-PD-Agar aufgetropft. Kombinationen der Wildtypen untereinander dienten als Kontrollen. Nach Inkubation für 2 Tage bei 22°C ließen sich die Kreuzungen auswerten.

Im Fall von *S. reilianum* (Maisisolat, SRM) wurde ebenfalls PD-Charcoal-Agar verwendet. Jedoch konnte hier kein weißes Mycel beobachtet werden. Statt dessen konnte man bei einer kompatiblen Paarungsreaktion eine Braunfärbung beobachten.

Im Fall von *S. reilianum* (Hirseisolat, SRH) war die Paarungsreaktion nicht so eindeutig. Mittels Binokular konnten Filamente bei kompatibler Paarungsreaktion auf PD-Charcoal-Agar und auf Wasser-Agar sichtbar gemacht werden.

7.2.11.4 Mikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *U. maydis* und *S. reilianum* kam ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioskop 2 (Firma Zeiss) zum Einsatz. Für die Mikroskopie wurden 5 µl einer frischen ÜNK auf einen mit 1,5 % Agarose beschichteten Objektträger aufgetropft und dieser mit einem Deckglas versehen. Die Mikroskopie erfolgte unter DIC-Belichtung oder mittels Epifluoreszenz. Hierbei wurden folgende Filtersätze verwendet: DAPI (Anregung: 365 nm, Farbteiler: 395 nm, Emission: >397 nm), FITC (Anregung: 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Emission: 515-565 nm), Rhodamin (Anregung: 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Emission: >590 nm). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden über das Programm MetaMorph (Version 6.2r6) erstellt. Es wurde eine CoolSNAP-HQ CCD Kamera (Photometrics) verwendet.

7.2.11.5 Färbungen

Färbung mit Calcofluor (*U. maydis* und *S. reilianum*)

Das zur mikroskopischen Analyse vorgesehene Blatt wurde für die Mikroskopie präpariert. Das Blattpräparat wurde kurz in H₂O eingetaucht und anschließend 30 sec bis 1 min in die Calcofluor-Färbelösung gelegt. Danach wurde das Präparat nochmals kurz in H₂O eingetaucht und anschließend mikroskopiert.

Calcofluor-Stammlösung:

10 mg/ml Fluorescent Brightener 28 (Sigma) in DMSO. Lagerung: dunkel bei -20°C

Calcofluor-Färbelösung:

1:100 Verdünnung der Stammlösung in H₂O oder 0,2 M Tris pH 8. Sollte täglich frisch angesetzt werden. Vor Lichteinstrahlung schützen.

Färbung mit Chlorazole Black E Färbung (*U. maydis*)

Präparierte Blattteile wurden über Nacht in Ethanol gelegt. Zur Permeabilisierung der pflanzlichen Zellwände wurden die Präparate mindestens vier Stunden bei 95 °C in 10% KOH behandelt, mit Wasser gewaschen und über Nacht bei 60°C in Chlorazole Black E Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde in 50% Glycerol entfärbt.

Chlorazole Black E Färbelösung:

0,03% Chlorazole Black E in einer 1:1:1 Lösung aus Wasser, Milchsäure und Glycerol.

Der Farbstoff wurde in Wasser gelöst, anschließend Milchsäure und Glycerol zugegeben.

Färbung mit WGA-Alexafluor/Propidiumiodid-Färbung

Um detailliert *in planta* –Mikroskopie mit dem Konfokal-Mikroskop durchzuführen, wurde eine gleichzeitige Färbung mit WGA-Alexafluor und Propidiumiodid durchgeführt. Dazu wurden zu analysierende Blattabschnitte ü. N. in Ethanol entfärbt. Dann wurden diese mit 10% KOH behandelt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 Tage bei 60 °C. Dann wurde das KOH mit 1 x PBS (pH 7,4) ersetzt. Die Färbelösung wurde frisch wie folgt angesetzt. 20 µg/ml Propidiumiodid, 10 µg/ml WGA (Wheat Germ Agglutinin)-AF(Alexa fuor), 0,02 % Tween 20 in 1 x PBS (pH 7,4).

7.2.12 UV-Mutagenese und Komplementation

In zwei unabhängigen Experimenten wurden *U. maydis* 521-Zellen (8×10^4 pro Platte) auf insgesamt 400 Trp-Agarplatten (ohne Tween 80) aufgetragen und einer UV-Dosis von 55-65 mJ/ cm² ausgesetzt, die einer Sterberate von ungefähr 1 % entsprach. Wobei der „Stratalinker-UV cross linker“ (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt wurde. Die Platten wurden bei 28°C im Dunkeln für 12 Tage inkubiert und nach Kolonien mit weißer, gelber oder schwarzer Koloniefarbe durchsucht. Ausgewählte Kolonien wurden auf Trp-Agar-Platten ausgestrichen und eine einzelne Kolonie wurde für die weitere Analyse ausgewählt. Die

Koloniefarbe der erhaltenen Mutanten wurde mit denen des Ausgangsstammes nach einem Wachstum von 7 Tagen auf Trp-Platten bei 28°C im Dunkeln verglichen. Mutanten, die eine Koloniefarbe aufwiesen, die sich von der des Wildtyps unterschieden, wurden aufbewahrt. Für die Komplementation wurden Protoplasten von ausgewählten Mutanten hergestellt, die mit einer genomischen Bank (8kb-Fragmente, F. Kaffarnik, J. Kämper und R. Kahmann, unveröffentlicht) von *U. maydis*-Wildtyp-Stamm 521 verglichen, die auf dem autonom replizierenden Plasmid pNEBUH (G. Weinzierl, unveröffentlicht) basierte. Jene überträgt Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin. Transformierte Protoplasten wurden auf Trp-Agar bei 28°C im Dunkeln regeneriert, die 1M Sorbitol und 150 µg/ml Hygromycin enthielten. Transformanten mit wiedererlangter Pigmentformationskapazität wurden auf Trp-Platten (mit 150 µg/ml Hygromycin) ausstrichen und eine einzelne Kolonie wurde genutzt, um Total-DNA nach dem Protokoll von Schulz (Schulz et al., 1990) zu präparieren. Total-DNA wurde für mind. 20 min auf einem Nitrozellulosefilter (0,025 µm, Millipore) gegen 10 % Glycerol dialysiert und für Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen benutzt. Die Plasmide von diesen Ampicillin-resistenten Transformanten wurden isoliert und mittels Restriktionsenzym PvuII analysiert. Plasmide mit unterschiedlichen Restriktionsmustern wurden zum Sequenzieren an das Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtung, Köln, Deutschland geschickt.

7.2.13 Pigmentinduktion

Zur Induktion der Pigmentbildung in *M. furfur* wurde ein Minimalagar verwendet, der um Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate reduziert wurde und nur aus einer Kohlenstoffquelle und einer Stickstoffquelle, nämlich Tryptophan bestand. Als Kohlenstoffquelle wurde für *M. furfur* Tween 80 angeboten, da dieser Pilz nur Fette als Kohlenstoffquelle verwerten kann.

Zur Induktion der Pigmentbildung in *U. maydis* wurde ein Minimalagar verwendet, dem als Kohlenstoffquelle Glukose und als Stickstoffquelle Tryptophan angeboten wurde. Um eine bessere Sekretion in den Agar und auch eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde auch hier Tween 80 zugesetzt. Tween 80 scheint die Oberflächenspannung herabzusetzen.

Zusammensetzung des Pigment-Agars für *M. furfur* (auf 100 ml):

0,3 g Tryptophan (Min 98%, Sigma Ultra)
 2 g Agar (Agar Agar reinst, Merck)
 3 ml Tween 80 (Tween 80, Sigma)
 97 ml H₂O

L-Tryptophan und Tween 80 wurden mit der autoklavierten, auf etwa fünfzig Grad abgekühlten Mischung aus Agar und Wasser vermischt und je ungefähr 30 ml in sterile Petrischalen ausgegossen.

Zusammensetzung des Basis-Pigment-Agars für *U. maydis* (auf 100 ml):

0,3 g Tryptophan (Min 98%, Sigma Ultra)
 2 g Agar (Agar Agar reinst, Merck)
 1 g Glucose
 3 ml Tween 80 (Tween 80, Sigma)
 97 ml H₂O

L-Tryptophan und Tween 80 wurden mit der autoklavierten, auf etwa fünfzig Grad abgekühlten Mischung aus Agar und Wasser vermischt und je ungefähr 30 ml davon in

sterile Petrischalen ausgegossen. Die Zusammensetzung konnte je nach Experiment variieren. So wurde wahlweise statt Trp IP zugesetzt oder sowohl Trp als auch IP. Für das Experiment zur Charakterisierung der Sulfitreduktasemutanten wurden Substanzen wie Methionin, Natriumsulfit, Natriumsulfat und Natriumsulfid oder Phenylpyruvat zugesetzt.

7.2.14 Pigmentgewinnung und Aufreinigung

7.2.14.1 Gewinnung des Rohextraktes aus *M. furfur*

Anzucht von *M. furfur* in Flüssigkultur ist bisher noch nicht experimentell möglich. Deshalb wurden 6 Tage auf mDixon-Agar gewachsene Kulturen von CBS 1878 mit einem sterilen Tupfer auf P- Agar ausgestrichen und zwei Wochen lang bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit ist der vorher transparente Nährboden durch das Pigment dunkelbraun verfärbt. Im UV-Licht bei 254 und 366 nm zeigen sich deutliche Fluoreszenzerscheinungen. Der Inhalt von je 20 Petrischalen wurde mit einem Pürierstab (Quelle, Fürth, FRG) fein zerkleinert und zur Pigmentextraktion mit Ethylacetat (Merck) aufgegossen. Nach 48 Stunden wurde das Extrakt über Glaswolle abfiltriert und mit Aqua dest. aufgegossen und ausgeschüttelt. Über einen Scheidetrichter konnten zwei Phasen getrennt werden, die obere Ethylacetat-Phase und die untere Wasserphase, die noch Agarreste enthält. Diese Vorreinigung des Rohextraktes ermöglichte eine bessere Trennung über die anschließend durchgeführte Säulenchromatographie. Nach Trocknung der oberen Phase über einen Rotationsverdampfer wurde das hochviskose Pigment in etwa 4 ml Methanol aufgenommen.

7.2.14.2 Gewinnung des Rohextraktes aus *U. maydis* und aus sterilen Kontrollplatten

Generell wurden die *U. maydis*-Stämme in YEPS-light-Medium auf eine OD₆₀₀ von 1,0 vorkultiviert und per Zentrifugation und Resuspension in Wasser auf eine OD₆₀₀ von 3,0 eingestellt. Mit Ausnahme der sterilen Kontrollplatten wurden alle Platten mit 500 µl der aufkonzentrierten Zellen gleichmäßig beimpft.

Für die Experimente, bei denen die Pigmentproduktion der *U. maydis*-Aminotransferasemutanten und die der sterilen Kontrollplatten analysiert wurde, wurden die Pigmente aus 35 Agar-Platten (Agar (20 g/l; Merck, Darmstadt, Germany), Glucose (50 mM), Tween 80 (3% v/v), und entweder Trp (15 mM) (Trp agar); IP (3 mM) (IP agar); oder IP (3 mM) und Trp (15 mM) (IP + Trp agar) extrahiert. Für die Experimente, bei denen die Sulfitreduktase-Mutanten analysiert wurden, wurden die Pigmente von jeweils fünf Trp-Agar-Platten extrahiert, mit oder ohne 1.3 mM Methionin (Met). Alle Platten wurden im Dunkeln bei 28°C für drei Tage inkubiert. Der Inhalt von diesen Petrischalen wurde dann mit einem Pürierstab (Quelle, Fürth, FRG) fein zerkleinert und zur Pigmentextraktion mit Ethylacetat (Merck) aufgegossen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis es zu einem Äquilibrium in der Pigmentkonzentration zwischen Agar und Ethylacetat kam. Dann wurde das Extrakt über Glaswolle abfiltriert und mit Aqua dest. aufgegossen und ausgeschüttelt. Über einen Scheidetrichter konnten zwei Phasen getrennt werden, die obere Ethylacetat-Phase und die untere Wasserphase, die noch Agarreste enthielt. Diese Vorreinigung des Rohextraktes ermöglichte eine bessere Trennung über die anschließend durchgeführte Säulenchromatographie. Nach Trocknung der oberen Phase über einen Rotationsverdampfer wurde das hochviskose Pigment in etwa 4 ml Methanol aufgenommen.

7.2.14.3 Säulenchromatographie

Lipophiles Sephadex LH 20 (Porengröße 25 – 100 µm, Sigma) ist ein hydroxyproliertes Derivat des Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Über eine Mitteldruck-Säulenchromatographie mittels MeOH als Elutionsmittel wurde das Rohextrakt im Falle von *M. furfur* unter UV-Licht (Desaga-GmbH, Heidelberg, Type 131200) in einzelne Fraktionen

aufgetrennt. Für die Experimente zur Charakterisierung der Sulfitreduktase-Mutanten wurden die Rohextrakte mittels einer Sephadex LH-20-Säule (20 cm x 1.5 cm) nur vom Tween 80 befreit, nicht aber fraktioniert. Für die Experimente zur Charakterisierung der Aminotransferase-Mutanten und der sterilen Kontroll-Platten hingegen wurden die Rohextrakte mit einer Sephadex LH-20-Säule (60 cm*3cm) fraktioniert. In letzterem Fall wurden stetig 200 ml Eluat pro Fraktion aufgefangen, unabhängig von der Fluoreszenz. Die durch die Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden dann mit dem Rotationsverdampfer (Heidolph, Schwalbach) eingedampft.

Nach Aufbringen des Rohextraktes wurde eine Flash-Birne (Schott Duran, 1000 ml) aufgesetzt, mit Methanol gefüllt und Druck über einen Gummiball aufgebaut. Die Laufzeit der Säule betrug etwa 130 min bei einem Fluß von ca. 19 ml/min und einem Elutionsvolumen von 2500 ml.

Die in getrennten Glasgefäßen aufgefangenen Fraktionen wurden mit einem Rotationsverdampfer getrocknet und in etwa 2,5 ml Methanol aufgenommen.

Sephadex LH 20 wurde regelmäßig regeneriert, um verminderte Trenneigenschaften durch Verschmutzung des Gels zu reduzieren. Dabei wurde wie folgt verfahren:

Nach durchgeführter Chromatographie bleibt das Sephadex auf der Säule. Nach Einsickern von ca 1 ml 2 N HCl wird die Säule mit Methanol gespült, bis ein pH von 7 erreicht ist.

7.2.14.4 Dünnschichtchromatographie

Die durch die Gelpermeationschromatographie aus dem Rohextrakt gewonnenen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie mit DC-Platten Kieselgel 60 (Merck) weiter aufgetrennt. Die Substanzen wurden unter Verwendung eines CAMAG Linomat V aufgetragen und mit dem Laufmittel Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure im Verhältnis 10:5:3 entwickelt.

(Laufkammern: Desaga, Heidelberg; Filterpapier: 20 x 20 cm, CAMAG, Berlin, Deutschland)

Einstellung des Linomaten zur analytischen Trennung der Fraktionen:

Plattenbreite 200 mm

Bandbreite 10 mm

Auftragsgeschwindigkeit 7 sec/µl

Startposition horizontal 10mm

Startposition vertikal 20 mm

Zwischenraum 7 mm

Aufzutragendes Volumen 20µl

Druck Hauptventil: 100 bar

Druck Reduzierventil: 5 bar

Die Charakterisierung der einzelnen Fraktionen erfolgte über die Beschreibung der DC-Platten im sichtbaren Licht und UV-Licht bei 254 und 366 nm sowie der R_f-Werte (Quotient aus der Entfernung einer Substanz vom Startpunkt und Laufmittelstrecke).

Weiterhin wurden die Platten im sichtbaren und im UV-Licht mit einem Photodokumentationssystem (CAMAG, Berlin) fotografiert. Damit konnten fluoreszierende Metabolite bei den definierten Wellenlängen 254 nm und 366 nm visualisiert werden.

7.2.14.5 EI-MS-Spektroskopie (Peter Spiteller, München)

EI-MS-Spektren wurden mit einem Thermo-Electron-DSQ (Austin, Texas, USA) ermittelt, die mit einer direkten Insertions-Sonde (EI bei 70°eV) ausgestattet war.

LC-HR-ESI-MS und LC-HR-ESI-MS/MS-Spektren wurden mit einem Thermo-Scientific-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (Austin, Texas, USA) ermittelt.

Das Spektrometer wurde im Positiv-Modus eingesetzt (1 Spectrum s-1; Massenbereich: 50–1000 mit einem nominalen Massenauflösungsvermögen von 60000 in $m/z = 400$ mit einer Scan-rate von 1 Hz) mit automatischer Verstärkungsregelung, um hoch-präzise Massen-Messungen mit nur 2 ppm Abweichung zu erzielen. Dafür wurde Polydimethyl-Cyclo-Siloxan ($[(CH_3)_2SiO]_6$, $m/z = 445.120025$) als interne Sperrmasse eingesetzt.

Das Spektrometer war mit einem Dionex-HPLC-System-Ultimate-3000, welcher aus einer Pumpe, einem UV-Detektor ($\lambda = 254$ nm), einem Flowmanager und einem Autosampler (Injektionsvolumen 0,5 μ l, Idstein, Deutschland). Stickstoff wurde als Schutzgas eingesetzt (6 arbiträre Einheiten) und Helium diente als Kollisionsgas. Die Auftrennungen wurden mit einer Gemini C-18-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland; 3 μ m, 0,3*150 mm) durchgeführt, wobei folgendes Gradienten-Programm angewandt wurde: 2 min bei 89.9% H_2O / 10% MeCN / 0.1% HCO_2H , dann innerhalb von 8 min linear zu 99.9% CH_3CN / 0.1% HCO_2H , dann 10 min bei 99.9% CH_3CN / 0.1% HCO_2H , Flussrate: 4 μ l min^{-1} .

Die Substanzen PCit, PyA, MI, MA und PitC in steriler Flüssigkultur wurden durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit publizierten Daten identifiziert (Brenner et al., 1988; Mayser et al., 2002; Irlinger et al., 2004; Irlinger et al., 2005).

PCit: Gelber Feststoff. 1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 297 K): $\delta = 7.27$ – 7.33 (m, 3 H, H-6, H-5', H-6'), 7.49– 7.52 (m, 1 H, H-7'), 7.60 (dd, 3JHH = 8.1 Hz, 3JHH = 8.2 Hz, H-7), 7.72 (d, 1 H, 3JHH = 8.2 Hz, H-8), 8.24 (d, 1 H, 3JHH = 7.9 Hz, H-5), 8.28 (d, 1 H, 3JHH = 5.0 Hz, H-4), 8.52 (d, 1 H, 3JHH = 5.0 Hz, H-3), 8.59– 8.62 (m, 1 H, H-4'), 9.05 (s, 1 H, H-2'). EI-MS: m/z (%) = 311 (67) $[M]^+$, 294 (100) $[M - NH_3]^+$, 282 (52), 255 (6), 166 (12), 155 (34), 144 (32), 127 (6), 116 (18), 89 (10).

PyA: Roter Feststoff. 1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 297 K): $\delta = 6.65$ (dd, 1 H, 3JHH = 7.3 Hz, 3JHH = 8.0 Hz, H-5), 6.86 (d, 1 H, 3JHH = 8.0 Hz, H-4), 7.02 (dd, 1 H, 3JHH = 7.3 Hz, 3JHH = 8.0 Hz, H-6), 7.37 (d, 1 H, 3JHH = 8.0 Hz, H-7), 7.85 (s, 1 H, H-2). EI-MS: m/z (%) = 328 (96) $[M]^+$, 300 (3) $[M - CO]^+$, 284 (7) $[M - CO_2]^+$, 256 (100) $[M - CO - CO_2]^+$, 227 (14), 200 (10), 150 (6), 144 (20), 128 (14), 114 (16), 101 (12).

MI: Gelber Feststoff. 1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 297 K): $\delta = 2.93$ (dd, 1 H, 2JHH = 16.0 Hz, 3JHH = 10.9 Hz, H-1), 3.53 (d, 1 H, 3JHH = 16.0 Hz, H-1), 4.58 (d, 1 H, 3JHH = 10.9 Hz, H-2), 5.31 (s, 1 H, H-5), 6.65 (s, 1 H, H-2'), 6.99 (dd, 1 H, 3JHH = 7.2 Hz, 3JHH = 7.9 Hz, H-5'), 7.01 (dd, 1 H, 3JHH = 7.0 Hz, 3JHH = 7.9 Hz, H-9), 7.09– 7.14 (m, 2 H, H-6', H-8), 7.31– 7.33 (m, 2 H, H-6', H-7), 7.47 (d, 1 H, 3JHH = 7.9 Hz, H-10), 7.68 (d, 1 H, 3JHH = 7.9 Hz, H-4').

LC-HR-ESI-MS: $m/z = 360.1343$ $[M + H]^+$, berechnet für $C_{21}H_{18}N_3O_3$ 360.1348.

MA: Gelber Feststoff. 1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 297 K): $\delta = 7.10$ (dd, 1 H, 3JHH = 6.7 Hz, 3JHH = 7.7 Hz, H-8), 7.21 (dd, 1 H, 3JHH = 7.1 Hz, 3JHH = 7.7 Hz, H-2), 7.37– 7.43 (m, 2 H, H-3, H-9), 7.47 (d, 1 H, 3JHH = 7.7 Hz, H-10), 7.53 (d, 1 H, 3JHH = 8.0 Hz, H-4), 8.15 (d, 1 H, 3JHH = 7.7 Hz, H-1), 8.39 (s, 1 H, H-12), 8.59 (d, 1 H, 3JHH = 6.7 Hz, H-7).

LC-HR-ESI-MS: $m/z = 329.0919$ $[M + H]^+$, berechnet für $C_{20}H_{13}N_2O_3$ 329.0926.

PitC: Roter Feststoff. LC-HR-ESI-MS: $m/z = 526.1397$ $[M + H]^+$, berechnet für $C_{32}H_{20}N_3O_5$ 526.1403.

7.2.14.6 LC-ESI-MS-Spektroskopie (Peter Karlovsky, Göttingen)

Die Fraktionen gewonnen aus den sterilen Kontrollplatten, den Sulfitreduktasemutanten und den Transaminasemutanten (2.3.2.3) wurden von Peter Karlovsky und Mitarbeitern (GAU Göttingen) wie folgt weiter analysiert. Nachweis der bereits bekannten Substanzen PCit, PyA, PyB, PyC in Fraktionen mittels LC-MS LC-ESI-MS und LC-ESI-MS/MS wurde mittels Varian-System durchgeführt, welches aus zwei Pumpen, einem Entgaser, einem Autosampler, einem Dioden-Array-Detektor und einem Säulenofen bestand (Varian, Darmstadt, Germany). Die Analyten wurden auf einer polar modifizierten RP-18-Säule (Synergi Fusion RP 80A column; 4 μ m, 100 mm x 2 mm i.d.; Phenomenex, Aschaffenburg,

Germany) aufgetrennt. Die Säule wurde konstant auf 40°C gehalten. Die Flussrate wurde auf 0.2 ml/min, das Injektionsvolumen war 10 µl. Lösungsmittel A war Wasser mit 7 mM Essigsäure, Lösungsmittel B war MeOH mit 7 mM Essigsäure. Die Proben wurden wie folgt in einem binären Gradienten aufgetrennt: 0–1 min 10% B, 1–21 min 10–98% B, gefolgt von Wasch- und Äquilibrationsschritten. Die Dioden-Array-Detektion wurde im Bereich von 200–500 nm mit einem Detektor ausgeführt, der dem nachfolgenden Massenspektrometer vorgeschaltet war. Für die MS-Detektion wurde ein Varian 1200 Dreifach-Quadrupol mit positivem und negativem ESI benutzt (Varian, Darmstadt, Deutschland). Die Temperatur war 200°C und der Gasfluss war 20 psi. Nadel-, Abschirmungs- und Kapillarspannung waren –3500/ –600/ –40 Volt für negativen ESI, and 5000/ 250/ 80 volts for positiven ESI. Die Fragmentation wurde in einer Kollisionszelle mit Argongas durchgeführt. Systemkontrolle wurde mittels Varian MS Workstation 6.5 (Varian, Darmstadt, Germany) gewährleistet. Die quantitative Bestimmung wurde in einem “single reaction monitoring” (SRM) für PitB and PitC, und in einem “multiple reaction monitoring” (MRM) für PyA and PCit durchgeführt. Die Substanzen PCit, PyA, PitC and PitB wurden durch Vergleich der spektroskopischen Daten (s. u.) mit publizierten Daten und durch Vergleich mit authentischen Proben bestimmt (Brenner et al., 1988; Mayser et al., 2002; Irlinger et al., 2004; Irlinger et al., 2005).

PCit: UV-Vis (MeOH/H₂O): λ = 315, 389 nm. LC-ESI-MS: Rt = 20.3 min, m/z = 312 [M + H]⁺. LC-ESI-MS/MS (parent ion m/z = 312): m/z = 195 [M + H – indole]⁺, 167 [M + H – indole-3-carbaldehyde]⁺.

PyA: UV-Vis (MeOH/H₂O): λ = 277, 389, 462 nm. LC-ESI-MS: Rt = 18.3 min, m/z = 327 [M – H][–]. LC-ESI-MS/MS (parent ion m/z = 327): m/z = 283 [M – CO₂H][–], 255 [M – CO₂H – CO][–].

PitC: UV-Vis (MeOH/H₂O): λ = 277, 323, 394, 462 nm. LC-ESI-MS: Rt = 16.5 min, m/z = 524 [M – H][–]. LC-ESI-MS/MS (parent ion m/z = 524): m/z = 480 [M – CO₂H][–], 452 [M – CO₂H – CO][–].

PitB: UV-Vis (MeOH/H₂O): λ = 277, 446 nm. LC-ESI-MS: Rt = 15.2 min, m/z = 523 [M – H][–]. LC-ESI-MS/MS (parent ion m/z = 523): m/z = 479.

Die Substanz Chrompyrrolsäure wurde in zusammengeführten Fraktionen der sterilen Platten, die Trp und IP enthielten, durch LC-ESI-MS/MS-Fragmentation des Parentalions [M – H]⁺ mit m/z 384 zum Fragment-Ion m/z 340 [M – CO₂][–] und m/z 296 [M – 2CO₂][–] nachgewiesen; unter den oben genannten Bedingungen mit einer Retentionszeit von 17.12 min entsprechend der Literatur (Nishizawa et al., 2006).

6-Formylindol[3,2-b]carbazol wurde in zusammengeführten Fraktionen identifiziert, die Trp und IP enthielten durch LC-ESI-MS/MS-Fragmentation des Parental-Ions [M + H]⁺ mit m/z 285 zum Fragment-Ion 255 [M – CHO + H]⁺ unter den oben genannten Bedingungen mit einer Retentionszeit von 22.5 min entsprechend der Literatur (Fritsche et al., 2007).

7.2.15 Fütterungsexperimente

Die *U. maydis*-Stämme, die auf Indolpyruvat-, Phenylalanin-, OMBA- oder Methioninbildung überprüft werden sollten, wurden in CM-Medium für 24 Stunden bei 28°C vorkultiviert und dann bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Zell-Pellets wurden so in sterilem Wasser resuspendiert, dass sie rechnerisch auf eine OD₆₀₀ von 3.0 gebracht wurden. 100 µl dieser Zellsuspensionen wurden zu jeweils 3 ml CM-Trp-Medium (Trp-Konz.: 5 mM) hinzugefügt, so dass sich eine Start- OD₆₀₀ von 0,1 ergab. Je nach Experiment enthielt das CM-Trp-Medium 1 mM Phenylpyruvat (PPy), 1 mM 2-Oxoglutarat (2-OG), oder 1 mM Oxo-Methylthiobutyrat (OMBA). Die Kulturen wurden für 14 h bei 28°C geschüttelt und wie oben beschrieben abzentrifugiert. 1 ml des Kulturüberstandes wurde in ein 2 ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und dann mit 20 µl HCl angesäuert. Zur Extraktion der

Substanzen wurde 750 µl EtOAc hinzugesetzt, wobei gründlich gevortext wurde und ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte. 500 µl der EtOAc-Phase wurde in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt und für 30 min in einer beheizten SpeedVac (UniEquip) eingedampft. Zur Indolpyruvat- und Phenylalanin-Messung wurden die Proben in einer wässrigen 20% (v/v) Acetonitril-Lösung (angesäuert mit 0,1% w/v Trifluor-Essigsäure) aufgenommen und mittels Probengefäß und automatischem Probenaufnehmer auf die HPLC (Beckman Gold) aufgebracht.

7.2.16 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die aus den Fütterungsexperimenten (7.2.15) und den Enzymaktivitätsexperimenten (7.2.19) gewonnenen Proben wurden über die „C18 Ultrasphere Column“ (5 µm, 4.6 x 250 mm, Beckman) laufen gelassen, wobei folgendes Elutionsprogramm angelegt wurde: zunächst 20% (v/v) Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser für 10 min, gefolgt von einem linearen Gradienten von 20 bis 40 % (v/v) Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure für 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Obwohl die höchste Absorption von IPA bei einer Wellenlänge von 220 nm beobachtet wurde, wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, um den Gehalt an IPA mit dem Gehalt an Phe besser vergleichbar zu machen. IPA eluierte bei 25.8 bis 26.2 min, während Phe bei 4.0 to 4.2 min eluierte. Die Peak-Fächen wurden integriert, und die Absorptionseinheiten wurden als % des Wildtyp-Mittelwerts berechnet. Drei unabhängige Proben wurden pro Experiment analysiert. Die IPA-Identität wurde im Vergleich zum Standard und durch „Spiken“ (Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen des Standards zur selben Probe) kontrolliert. Die Phe-Identität wurde im Folgenden von Peter Karlovsky und Mitarbeitern (Göttingen) durch MS/MS-Analyse nach der Lösemittelverdampfung verifiziert. Die Proben wurden wieder in der mobilen Phase gelöst und analysiert, wobei dieselben Bedingungen wie für Met angewendet wurden (s. unten). Die Retentionszeit war 3.5 min. Die MS/MS Detektion wurde im Positiv-Modus durchgeführt, wobei die Transition 166>120 als Quantifizierer und die Transition 166>103 als Qualifizierer genutzt wurde.

Zur Analyse der Met-Konzentration wurden die Proben in Niedrig-pH-Puffer (0,1% Ameisensäure) gelöst, um vollständige Solvatisierung zu gewährleisten und filtriert. Eine Auftrennung von einer 10-µl- Probe wurde auf einer ZIC-HILIC Zwitterionen-Säule (100*2.1 mm, 3.5 µ, Sequant, Umeå, Sweden) unter isokraten Bedingungen mit pH- und Temperaturkontrolle (Acetonitril/Ammonium-Acetat (20 mM, pH 6.5), 80/20; 40°C) und einer Flussrate von 0,1 ml/min erreicht. Met eluierte mit einer Retentionszeit von 4,9 min. MS/MS-Detektion wurde im Positiv-Modus durchgeführt, wobei die Transition 150>104 als Quantifizierer und die Transition 150>133 als Qualifizierer eingesetzt wurde.

7.2.17 Komplementation von 521sir1Δ^{1054–1499} durch Phenylpyruvat

Um die Komplementation von 521sir1Δ^{1054–1499} mit Phenylpyruvat zu testen, wurde eine ÜNK von 521sir1Δ^{1054–1499} #11 20 Mal mit der doppelten Menge an Wasser gewaschen. Dann folgte ein weiterer Waschschrift bei 4°C für 14h ohne zu schütteln. Die Zellen wurden in Wasser resuspendiert und in einer OD von 2 und einem Volumen von 1 ml auf Trp-Agar mit und ohne 1 mM PPy aufgetragen.

7.2.18 Tam1-Überexpression und Aufreinigung

Die verifizierten Plasmide sowie ein leeres pET15b-Kontroll-Plasmid wurden in den *E.coli*-Stamm Rosetta (DE) pLysS (Novagen, Madison, WI, SA) transformiert. Eine ÜNK (4ml) von Rosetta (DE) pLysS pET15b-Tam1 wurde in 300 ml YT-Medium (100 µg ml⁻¹

Ampicillin and $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol) verdünnt und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD von 0,7 erreicht war. Nach der Zugabe von 0,4 mM IPTG zum Kulturmedium wurden die Zellen bei 16°C für 2,5 h inkubiert und für 20 min bei 4°C pelletiert. Sie konnten nun bei -80°C gelagert werden.

Die Aufreinigung 6xHis-markierter Proteine bietet neben der hohen Spezifität den Vorteil, diese Proteine bei milden Bedingung im neutralen pH-Bereich eluieren zu können. Die Präparation der zellfreien Extrakte und die Tam1-Aufreinigung wurden wie im „QIA expressionist handbook“ unter Protokoll 9 „Preparation of cleared *E. coli* lysates under native conditions“ und 12 „Batch purification of 6xHis-tagged proteins from *E. coli* under native conditions“ beschrieben durchgeführt. Das im Elutionspuffer befindliche Imidazol wurde in verschiedenen Konzentrationen (100, 150, 200, 250 und 500 mM) eingesetzt.

Proteinkonzentrationen wurden wie unter 7.2.10.1 beschrieben nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Die Identität des Tam1-Proteins wurde mittels MALDI-TOF MS/MS (Kahnt et al., 2007) überprüft.

7.2.19 Tam1-Enzymaktivitätsexperimente

Um die Funktion von Tam1 zu überprüfen, wurden folgende Reaktionsgemische angesetzt: 200 μl Gesamtvolumen beinhalteten 100 mM Tris-HCl (pH 6.7), 250 μM Pyridoxalphosphat, 2 mM Aminogruppenakzeptor (PPy, 2-OG oder OMBA) und 2 mM Aminodonor (Trp, Phe oder Met). Das Tam1-Enzym wurde in einer 2 μM Konzentration eingesetzt. Der Elutionspuffer „5“ (500 mM Imidazol) diente als Negativ-Kontrolle, um einen Effekt des Imidazols auszuschließen. Wasch- und Elutionsfraktionen des Rosetta (DE) pLysS pET15b – Stammes wurden unter allen angewandten Assay-Bedingungen eingesetzt, um einen Effekt von *E. coli*-Proteinen auszuschließen. Letztere zeigten unter den verwendeten Bedingungen keine enzymatische Aktivität. Die Reaktionen wurden bei 48°C im Zeitraum einer Stunde ausgeführt, durch Schock-Gefrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt und bei -20°C aufbewahrt.

Die in den Proben enthaltenen Trp-, IPA- und Phe- Konzentrationen wurden mittels HPLC (Beckman Gold) auf einer C18 ultrasphere column (5 μm , 4,6 x 250 mm, Beckman) bestimmt (7.2.16). Folgendes Elutionsprogramm wurde angewandt: 20 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser für 10 min, gefolgt von einem linearen Gradienten von 20-40 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure für 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Absorption von allen drei Substanzen wurde bei 260 nm gemessen. Trp eluierte bei 5.1-5.3 min, IPA bei 25.8-26.1 min und Phe bei 4.1-4.1 min. Die Peak-Flächen wurden integriert und die Absorptions-Einheiten quantifiziert. Es fiel auf, dass eine beträchtliche Menge an IPA spontan zur Bildung von IAA reagierte. Deshalb wurde die IPA-Konzentration aus der Summe der IPA- und IAA-Peak-Flächen in Relation zum Standard berechnet. Da IPA zu einer ganzen Reihe weiterer Komponenten reagiert, ist die wirkliche Konzentration an produzierter IPA höher als die hier bestimmte. Die Trp-Konzentrationen wurden berechnet, indem der Wert der Negativkontrollexperimente (Versuchsbedingungen 1-5, Abb. 21) auf 2 mM gesetzt wurde. Die Phe- und Met-Konzentrationen wurden relativ zu den Negativkontrollexperimenten 7 bzw. 6 berechnet, welche auf 2 mM gesetzt wurden. Die Analyse der Met-Konzentration wurde wie unter 7.2.16 beschrieben durchgeführt. Jeder Versuch wurde dreimal ausgeführt.

7.2.20 Untersuchungen an HaCaT-Zellen zur Analyse des Effekts von Indolpyruvat

7.2.20.1 Detektion von Interleukin 6 mittels ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay)

HaCaT-Zellen wurden in 24-Well-Platten zu 100.000 Zellen/Well im Experiment mit FICZ bzw. in 96-Well-Platten zu 10.000 Zellen/Well im Experiment mit α -Naphthoflavon (α NF) ausplattiert und dann über Nacht im Brutschrank inkubiert, um Adhärenz zu gewährleisten. Im Experiment mit α NF wurden zwei Platten - eine Platte als „HaCaT-Zellen-Testplatte“ zur späteren UV-Bestrahlung (Testplatte) und eine andere Platte als „HaCaT-Zellen-Kontrollplatte“ (Kontrollplatte) verwendet. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Magermedium (DMEM ohne FCS) getauscht, um die Grundstimulation zu vermindern. Die Zellen in den Wells wurden am dritten Tag in Triplets mit 300 μ l Kontrollpuffer (PBS + 0,2 % DMSO), im Experiment mit FICZ 300 μ l Agonistenpuffer (PBS + 10 μ M FICZ + 0,2 % DMSO), im Experiment mit α NF 300 μ l Antagonistenpuffer (PBS + 10 μ M α -Naphthoflavon) und 300 μ l Testpuffer (PBS + 100 μ M Indolpyruvat) behandelt. Indolpyruvat wurde immer frisch angesetzt. Um zu gewährleisten, dass sich eine hinreichend große Menge an Indolpyruvat-abhängigen Stoffen bilden konnte, wurde eine 10fach höhere Konzentration an Indolpyruvat eingesetzt. Die Zellen wurden dann eine weitere Stunde inkubiert. Nach dieser Stunde Inkubationszeit wurden die Zellen der Testplatte mit 30 mJ/cm² UV mittels Stratalinker (UV-crosslinker, Stratagene, Heidelberg) bestrahlt. Die Kontrollplatten blieben dabei im Brutschrank. Direkt nach der Bestrahlung wurden sowohl von Test- als auch von Kontrollplatte die Überstände abpipettiert (2 mal 100 μ l pro Probe) und als Proben zum Zeitpunkt „0“ bei -20°C eingefroren. Die restlichen Puffer wurden gegen Wachstumsmedien [(Kontrollmedium (DMEM + 0,2 % DMSO), Agonistenmedium (DMEM + 10 μ M FICZ + 0,2 % DMSO), Antagonistenmedium (DMEM + 10 μ M α -NF) und Testmedium (DMEM + 100 μ M Indolpyruvat)] ersetzt. Nach weiterer Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

Die Zeitpunkte, an denen Proben genommen wurden, waren 1h im Fall vom Experiment mit FICZ 1h, im Fall vom Experiment mit α NF 16h und 24h. Der IL-6-Gehalt wurde mit dem BD-OpteiA-Interleukin-6-Set über einen Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) strikt nach den Angaben des Herstellers und mittels Tecan Saphir Plate Reader bei 570 nm Wellenlänge und 450 nm Referenzwellenlänge bestimmt. Als ELISA-Platten dienten Greiner-high-absorption-96-well-flat-bottom-Platten. Die Hintergrundwerte wurden von den gemessenen Absorptionswerten abgezogen. Da einige Werte leicht negativ waren, wurden diese bei der späteren Auswertung manuell auf „0“ gesetzt. Die übrigen positiven Werte

wurden dekadisch logarithmiert und die logarithmierten Konzentrationswerte mittels Funktion der Standardkurve berechnet. Mit diesen logarithmierten Konzentrationswerte musste dann die Exponentialfunktion zur Basis 10 berechnet werden.

7.2.20.2 UV-Bestrahlungsexperimente mit HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden mit Kontrollmedium (DMEM + 0,2 % DMSO) und Testmedium (DMEM + 100 μ M Indolpyruvat) für 8 Tage im Dunkeln inkubiert und dreimal (an Tag 1, 4 und 7) mit UV-Licht (20 mJ/cm²) bestrahlt. Jeweils vor der UV-Bestrahlung wurde das Medium gegen Kontrollpuffer (PBS + 0,2 % DMSO) bzw. gegen Testpuffer (PBS + 100 μ M Indolpyruvat) getauscht, wobei direkt nach der Bestrahlung den Zellen neues Medium angeboten wurde. Am Ende des Experimentes wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

7.2.21 UV-Bestrahlungsexperimente mit *U. maydis*-Zellen

U. maydis-521-Zellen (WT) und *U. maydis*- Δ tam1-Zellen (Δ tam1) wurden in AM mit oder ohne IP (0,8 mM) über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die auf eine OD=2 eingestellten, gewaschenen, unverdünnten Kulturen und Verdünnungen daraus (jeweils 1/10) auf zwei AM-Platten aufgetropft. Eine dieser Platten wurde mit 40 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt.

8 Literatur

- Abbott, B.D., und Probst, M.R.** (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn* **204**, 144-155.
- Abbott, B.D., Birnbaum, L.S., und Perdew, G.H.** (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn* **204**, 133-143.
- Abramczyk, D., Tchorzewski, M., und Grankowski, N.** (2003). Non-AUG translation initiation of mRNA encoding acidic ribosomal P2A protein in *Candida albicans*. *Yeast* **20**, 1045-1052.
- Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E., und Beynon, J.L.** (2004). Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* **306**, 1957-1960.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Pritchard, L., Bos, J.I., Venter, E., Avrova, A.O., Rehmany, A.P., Bohme, U., Brooks, K., Cherevach, I., Hamlin, N., White, B., Fraser, A., Lord, A., Quail, M.A., Churcher, C., Hall, N., Berriman, M., Huang, S., Kamoun, S., Beynon, J.L., und Birch, P.R.** (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7766-7771.
- Asai, S., und Yoshioka, H.** (2009). Nitric Oxide as a Partner of Reactive Oxygen Species Participates in Disease Resistance to Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 619-629.
- Asamizu, S., Kato, Y., Igarashi, Y., Furumai, T., und Onaka, H.** (2006). Direct formation of chromopyrrolic acid from indole-3-pyruvic acid by StaD, a novel hemoprotein in indolocarbazole biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **47**, 473-475.
- Asamizu, S., Kato Y., Igarashi Y., Furumai T., Onaka, H.** (2007). VioE, a prodeoxyviolacein synthase involved in violacein biosynthesis, is responsible for intramolecular indole rearrangement. *Tetrahedron Letters* **48**, 2923-2926.
- Baim, S.B., und Sherman, F.** (1988). mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 1591-1601.
- Baker, S.E., Kroken, S., Inderbitzin, P., Asvarak, T., Li, B.Y., Shi, L., Yoder, O.C., und Turgeon, B.G.** (2006). Two polyketide synthase-encoding genes are required for biosynthesis of the polyketide virulence factor, T-toxin, by *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 139-149.
- Balibar, C.J., und Walsh, C.T.** (2006). In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry* **45**, 15444-15457.
- Balibar, C.J., Howard-Jones, A.R., und Walsh, C.T.** (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat Chem Biol* **3**, 584-592.
- Ballance, G.M., Lamari, L., Kowatsch, R., und Bernier, C.C.** (1996). Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol. Plant Pathol.*
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Baroni, A., Perfetto, B., Paoletti, I., Ruocco, E., Canozo, N., Orlando, M., und Buommino, E.** (2001). *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression. *Arch Dermatol Res* **293**, 414-419.
- Bartetzko, V., Sonnewald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U.Z., und Bornke, F.** (2009). The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Type III Effector Protein XopJ Inhibits Protein Secretion: Evidence for Interference with Cell Wall-Associated Defense Responses. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 655-664.
- Basavaraju, P., Shetty, N.P., Shetty, H.S., de Neergaard, E., und Jorgensen, H.J.** (2009). Infection biology and defence responses in sorghum against *Colletotrichum sublineolum*. *J Appl Microbiol.*
- Basse, C.W., Lottspeich, F., Steglich, W., und Kahmann, R.** (1996). Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eur J Biochem* **242**, 648-656.

- Bauer, R., Mendgen, K., und Oberwinkler, F. (1995). Cellular interaction of the smut fungus *Ustilago waldsteiniae*. *Can J Bot* **73**, 867–883.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., und Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783–795.
- Bergander, L., Wincent, E., Rannug, A., Foroozesh, M., Alworth, W., und Rannug, U. (2004). Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact* **149**, 151–164.
- Berger, L.C., Wilson, J., Wood, P., und Berger, B.J. (2001). Methionine regeneration and aspartate aminotransferase in parasitic protozoa. *J Bacteriol* **183**, 4421–4434.
- Birch, P.R., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S., und Beynon, J.L. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* **14**, 8–11.
- Birnbaum, L.S., und Tuomisto, J. (2000). Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit Contam* **17**, 275–288.
- Bittinger, M.A., Nguyen, L.P., und Bradfield, C.A. (2003). Aspartate aminotransferase generates proagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* **64**, 550–556.
- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J., und Kahmann, R. (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547–552.
- Bos, J.I., Kanneganti, T.D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R., und Kamoun, S. (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **48**, 165–176.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., und Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216–226.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Brenner, M., Rexhausen, H., Steffan, B., und Steglich, W. (1988). Synthesis of Arcyriarubin B and Related Bisindolylmaleimides. *Tetrahedron* **44**, 2887–2892.
- Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., und Baca, B. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet*. **264**, 521–530.
- Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A., und Ellis, J.G. (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* **18**, 243–256.
- Chang, K.J., und Wang, C.C. (2004). Translation initiation from a naturally occurring non-AUG codon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 13778–13785.
- Charles, C.R., Sire, D.J., Johnson, B.L., und Beidler, J.G. (1973). Hypopigmentation in *tinea versicolor*: a histochemical and electronmicroscopic study. *Int J Dermatol* **12**, 48–58.
- Chen, S.J., Ko, C.Y., Yen, C.W., und Wang, C.C. (2009). Translational efficiency of redundant ACG initiator codons is enhanced by a favorable sequence context and remedial initiation. *J Biol Chem* **284**, 818–827.
- Chiaro, C.R., Patel, R.D., und Perdew, G.H. (2008). 12(R)-Hydroxy-5(Z),8(Z),10(E),14(Z)-eicosatetraenoic acid [12(R)-HETE], an arachidonic acid derivative, is an activator of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* **74**, 1649–1656.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A., und Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett* **277**, 1–10.
- Cigan, A.M., und Donahue, T.F. (1987). Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast—a review. *Gene* **59**, 1–18.
- Ciuffetti, L.M., Tuori, R.P., und Gaventa, J.M. (1997). A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell* **9**, 135–144.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quiros, M., Leon, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gomez, M., und del Rio, L.A. (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol* **136**, 2722–2733.
- Cui, F., She, X.D., Li, X.F., Shen, Y.N., Lu, G.X., und Liu, W.D. (2007). [Effects of *Malassezia* isolates on cytokines production associated with melanogenesis by keratinocytes]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **29**, 196–200.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H.,

- Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., und Kitajima, J.P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**, 459-463.
- De Lange, T. (2005). Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 197-204.
- de Pinto, M.C., Tommasi, F., und De Gara, L. (2002). Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* **130**, 698-708.
- Delacote, F., und Lopez, B.S. (2008). Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* **7**, 33-38.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., und Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., und Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13454-13459.
- Detmar, J., Rabaglino, T., Taniuchi, Y., Oh, J., Acton, B.M., Benito, A., Nunez, G., und Jurisicova, A. (2006). Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. *Apoptosis* **11**, 1413-1425.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., und Kahmann, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Dong, S., Qutob, D., Tedman-Jones, J., Kuflu, K., Wang, Y., Tyler, B.M., und Gijzen, M. (2009). The *Phytophthora sojae* avirulence locus *Avr3c* encodes a multi-copy RXLR effector with sequence polymorphisms among pathogen strains. *PLoS ONE* **4**, e5556.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Wang, X., Jiang, R.H., Arredondo, F.D., Anderson, R.G., Thakur, P.B., McDowell, J.M., Wang, Y., und Tyler, B.M. (2008). Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector *Avr1b*. *Plant Cell* **20**, 1118-1133.
- Doukyu, N., Arai, T., Aono, R. (1998). Effects of organic solvents on indigo formation by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 grown with high levels of indole. *Biosci Biotech Bioch* **62**, 1075-1080.
- Drewlo, S., Bramer, C.O., Madkour, M., Mayer, F., und Steinbuchel, A. (2001). Cloning and expression of a *Ralstonia eutropha* HF39 gene mediating indigo formation in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1964-1969.
- Duncan, D.M., Burgess, E.A., und Duncan, I. (1998). Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev* **12**, 1290-1303.
- Eaton, R.W.C., P.J. (1995). Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. *Journal of Bacteriology* **177**, 6983-6988.
- Feldbrugge, M., Kamper, J., Steinberg, G., und Kahmann, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., und Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires *PHYTOALEXIN DEFICIENT3*. *Plant Physiol* **144**, 367-379.
- Flor, H.H. (1946). Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Journal of Agricultural Research* **73**, 335-357.
- Friesen, T.L., Stukenbrock, E.H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J.D., Rasmussen, J.B., Solomon, P.S., McDonald, B.A., und Oliver, R.P. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat Genet* **38**, 953-956.
- Fritsche, E., Schäfer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hübenthal, U., Cline, J.E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., Klotz, L.O., Rannug, A., Fürst, P., Hanenberg, H., Abel, J., und Krutmann, J. (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8851-8856.
- Funnell, D.L., und VanEtten, H.D. (2002). Pisatin demethylase genes are on dispensable chromosomes while genes for pathogenicity on carrot and ripe tomato are on other chromosomes in *Nectria haematococca*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 840-846.
- Gabaldon, C., Gomez Ros, L.V., Pedreno, M.A., und Ros Barcelo, A. (2005). Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol* **165**, 121-130.

- Galadari, I., el Komy, M., Mousa, A., Hashimoto, K., und Mehregan, A.H.** (1992). Tinea versicolor: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. *Int J Dermatol* **31**, 253-256.
- Gambichler, T., Kramer, H.J., Boms, S., Skrygan, M., Tomi, N.S., Altmeyer, P., und Mayser, P.** (2007). Quantification of ultraviolet protective effects of pityriacitrin in humans. *Arch Dermatol Res* **299**, 517-520.
- Garbe, T.R., Kobayashi, M., Shimizu, N., Takesue, N., Ozawa, M., und Yukawa, H.** (2000). Indolyl carboxylic acids by condensation of indoles with alpha-keto acids. *J Nat Prod* **63**, 596-598.
- Gaupels, F., Furch, A.C., Will, T., Mur, L.A., Kogel, K.H., und van Bel, A.J.** (2008). Nitric oxide generation in *Vicia faba* phloem cells reveals them to be sensitive detectors as well as possible systemic transducers of stress signals. *New Phytol* **178**, 634-646.
- Genger, R.K., Jurkowski, G.I., McDowell, J.M., Lu, H., Jung, H.W., Greenberg, J.T., und Bent, A.F.** (2008). Signaling pathways that regulate the enhanced disease resistance of *Arabidopsis* "defense, no death" mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1285-1296.
- Gilchrist, D.G.** (1998). Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu Rev Phytopathol* **36**, 393-414.
- Gladyshev, E.A., und Arkhipova, I.R.** (2007). Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9352-9357.
- Gladyshev, E.A., und Arkhipova, I.R.** (2009). A single-copy IS5-like transposon in the genome of a bdelloid rotifer. *Mol Biol Evol*.
- Glawischig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., und Halkier, B.A.** (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8245-8250.
- Glawischig, E.** (2007). Camalexin. *Phytochemistry* **68**, 401-406.
- Gordon, T.R., und Martyn, R.D.** (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol* **35**, 111-128.
- Govrin, E.M., und Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**, 751-757.
- Govrin, E.M., Rachmilevitch, S., Tiwari, B.S., Solomon, M., und Levine, A.** (2006). An Elicitor from *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* and Other Plants and Promotes the Gray Mold Disease. *Phytopathology* **96**, 299-307.
- Gruen, H.E.** (1959). Auxins and Fungi. *Annu Rev Plant Physiol* **10**, 405-440.
- Grundmann, A., und Li, S.M.** (2005). Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.
- Gueho, E., Midgley, G., und Guillot, J.** (1996). The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 337-355.
- Gupta, A.K., Batra, R., Bluhm, R., und Faergemann, J.** (2003). Pityriasis versicolor. *Dermatol Clin* **21**, 413-429, v-vi.
- Halisky, P.M.** (1963). Head smut of sorghum, Sudangrass and corn caused by *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clinton. *Hilgardia* **34**, 287-304.
- Hamilton, R., Watanabe, C.K., und de Boer, H.A.** (1987). Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Nucleic Acids Res* **15**, 3581-3593.
- Han, Z., Miwa, Y., Obikane, H., Mitsumata, M., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., und Sasaguri, T.** (2008). Aryl hydrocarbon receptor mediates laminar fluid shear stress-induced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **77**, 809-818.
- Hanna, G.D.** (1929). Another Synthetic Resin Useful in Microscopy. *Science* **70**, 16-17.
- Haviv-Chesner, A., Kobayashi, Y., Gabriel, A., und Kupiec, M.** (2007). Capture of linear fragments at a double-strand break in yeast. *Nucleic Acids Res* **35**, 5192-5202.
- Hedh, J., Johansson, T., und Tunlid, A.** (2009). Variation in host specificity and gene content in strains from genetically isolated lineages of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* s. lat. *Mycorrhiza*.
- Henley, D.V., Bellone, C.J., Williams, D.A., Ruh, T.S., und Ruh, M.F.** (2004). Aryl hydrocarbon receptor-mediated posttranscriptional regulation of IL-1beta. *Arch Biochem Biophys* **422**, 42-51.
- Hennebert, G.L.** (1973). *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* **7**.
- Hennig, B., Meerarani, P., Slim, R., Toborek, M., Daugherty, A., Silverstone, A.E., und Robertson, L.W.** (2002). Proinflammatory properties of coplanar PCBs: in vitro and in vivo evidence. *Toxicol Appl Pharmacol* **181**, 174-183.
- Hirano, S., Asamizu, S., Onaka, H., Shiro, Y., und Nagano, S.** (2008). Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. *J Biol Chem* **283**, 6459-6466.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., und Phillips, D.H.** (2007). AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem Res Toxicol* **20**, 1797-1810.

- Hoffman, C.S., und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. (New York: Plenum Press).
- Hollingshead, B.D., Beischlag, T.V., Dinatale, B.C., Ramadoss, P., und Perdew, G.H. (2008). Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Res* **68**, 3609-3617.
- Hoshino, T., und Yamamoto, M. (1997). Studies on the biosynthesis of violacein, part VIII. Conversion from tryptophan precursor into violacein pigments by a cell-free system from *Chromobacterium violaceum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 2134-2136.
- Howard-Jones, A.R., und Walsh, C.T. (2007). Nonenzymatic Oxidative Steps Accompanying Action of the Cytochrome P450 Enzymes StaP and RebP in the Biosynthesis of Staurosporine and Rebeccamycin. *J Am Chem Soc* **129**, 11016-11017.
- Huang, G., und Elferink, C.J. (2005). Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest. *Mol Pharmacol* **67**, 88-96.
- Huang, H.Y., Tang, H.L., Chao, H.Y., Yeh, L.S., und Wang, C.C. (2006). An unusual pattern of protein expression and localization of yeast alanyl-tRNA synthetase isoforms. *Mol Microbiol* **60**, 189-198.
- Idris EE, I.D., Talon M, Borriss R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 619-626.
- Insausti, T.C., und Casas, J. (2008). The functional morphology of color changing in a spider: development of ommochrome pigment granules. *J Exp Biol* **211**, 780-789.
- Iraqui, I., Vissers, S., Cartiaux, M., und Urrestarazu, A. (1998). Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet* **257**, 238-248.
- Irlinger, B., Krämer, H.J., Mayser, P., und Steglich, W. (2004). Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 1098-1100.
- Irlinger, B., Bartsch, A., Krämer, H.J., Mayser, P., und Steglich, W. (2005). New tryptophan metabolites from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Helv Chim Acta* **88**, 1472-1485.
- Jensen, R.A., und Gu, W. (1996). Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of Family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J Bacteriol* **178**, 2161-2171.
- Jia, Y., und Martin, R. (2008). Identification of a new locus, Ptr(t), required for rice blast resistance gene Pi-ta-mediated resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 396-403.
- Jiang, R.H., Tripathy, S., Govers, F., und Tyler, B.M. (2008). RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4874-4879.
- Jones, J.D., und Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jurkowski, G.I., Smith, R.K., Jr., Yu, I.C., Ham, J.H., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Fengler, K.A., und Bent, A.F. (2004). Arabidopsis DND2, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 511-520.
- Kaffarnik, F., Muller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., und Feldbrugge, M. (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *Embo J* **22**, 5817-5826.
- Kahnt, J., Buchenau, B., Mahlert, F., Kruger, M., Shima, S., und Thauer, R.K. (2007). Post-translational modifications in the active site region of methyl-coenzyme M reductase from methanogenic and methanotrophic archaea. *Febs J* **274**, 4913-4921.
- Kalmes, M., Neumeyer, A., Rio, P., Hanenberg, H., Fritsche, E., und Blomeke, B. (2006). Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). *Biol Chem* **387**, 1201-1207.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 41-60.
- Kämper, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Sneltselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrugge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D.,

- Oosterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., und Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kaper, J.M., und Veldstra, H. (1958). On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim Biophys Acta* **30**, 401-420.
- Kesavan, S., Walters, C.E., Holland, K.T., und Ingham, E. (1998). The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Med Mycol* **36**, 97-106.
- Kobayashi, K., und Yoshimoto, A. (1982). Studies on yeast sulfite reductase. IV. Structure and steady-state kinetics. *Biochim Biophys Acta* **705**, 348-356.
- Koga, J. (1995). Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1249**, 1-13.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **12**, 857-872.
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**, 19867-19870.
- Kradolfer, P., Niederberger, P., und Hutter, R. (1982). Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch Microbiol* **133**, 242-248.
- Krämer, H.J., Kessler, D., Hippler, U.C., Irlinger, B., Hort, W., Bödeker, R.H., Steglich, W., und Mayser, P. (2005). Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcyriarubin A. *Chembiochem* **6**, 2290-2297.
- Krämer, H.J., Podobinska, M., Bartsch, A., Battmann, A., Thoma, W., Bernd, A., Kummer, W., Irlinger, B., Steglich, W., und Mayser, P. (2005). Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* **6**, 860-865.
- Larangeira de Almeida, H., Jr., und Mayser, P. (2006). Absence of sunburn in lesions of pityriasis versicolor alba. *Mycoses* **49**, 516.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., und Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lievens, B., Rep, M., und Thomma, B.P. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Manag Sci* **64**, 781-788.
- Linning, R., Lin, D., Lee, N., Abdennadher, M., Gaudet, D., Thomas, P., Mills, D., Kronstad, J.W., und Bakkeren, G. (2004). Marker-based cloning of the region containing the UvA1 avirulence gene from the basidiomycete barley pathogen *Ustilago hordei*. *Genetics* **166**, 99-111.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D., und Sandberg, G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **49**, 249-272.
- Lo, H.L., Nakajima, S., Ma, L., Walter, B., Yasui, A., Ethell, D.W., und Owen, L.B. (2005). Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer* **5**, 135.
- Lopes, S.C., Blanco, Y.C., Justo, G.Z., Nogueira, P.A., Rodrigues, F.L., Goelnitz, U., Wunderlich, G., Facchini, G., Brocchi, M., Duran, N., und Costa, F.T. (2009). VIOLACEIN EXTRACTED FROM *Chromobacterium violaceum* INHIBITS PLASMODIUM GROWTH IN VITRO AND IN VIVO. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Lopez, L., Camas, A., Shivaji, R., Ankala, A., Williams, P., und Luthe, D. (2007). Mir1-CP, a novel defense cysteine protease accumulates in maize vascular tissues in response to herbivory. *Planta* **226**, 517-527.
- Lopez-Serrano, M., Del Campo, E.M., Sabater, B., und Martin, M. (2001). Primary transcripts of *ndhD* of Liliaceae and Aloaceae require editing of the start and 20th codons. *J Exp Bot* **52**, 179-180.
- Lou, Y.C., Huang, Y.C., Pan, Y.R., Chen, C., und Liao, Y.D. (2006). Roles of N-terminal pyroglutamate in maintaining structural integrity and pKa values of catalytic histidine residues in bullfrog ribonuclease 3. *J Mol Biol* **355**, 409-421.
- Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., Brendel, V., und Bogdanove, A.J. (2008). Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* **3**, e3828.
- Ma, C., Marlowe, J.L., und Puga, A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor at the crossroads of multiple signaling pathways. *Exs* **99**, 231-257.
- Machowinski, A., Krämer, H.J., Hort, W., und Mayser, P. (2006). Pityriacitrin--a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* **49**, 388-392.

- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.M., und Turner, G. (2006). The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem* **7**, 1062-1069.
- Mandel, M.J., Wollenberg, M.S., Stabb, E.V., Visick, K.L., und Ruby, E.G. (2009). A single regulatory gene is sufficient to alter bacterial host range. *Nature* **458**, 215-218.
- Manning, V.A., und Ciuffetti, L.M. (2005). Localization of Ptr ToxA Produced by *Pyrenophora tritici-repentis* Reveals Protein Import into Wheat Mesophyll Cells. *Plant Cell* **17**, 3203-3212.
- Maor, R., und Shirasu, K. (2005). The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* **8**, 399-404.
- Matzuk, M.M. (2001). Eggs in the balance. *Nat Genet* **28**, 300-301.
- Mayser, P., Wille, G., Imkampe, A., Thoma, W., Arnold, N., und Monsees, T. (1998). Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* **41**, 265-271.
- Mayser, P., und Pape, B. (1998). Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 315-319.
- Mayser, P., Schäfer, U., Krämer, H.J., Irlinger, B., und Steglich, W. (2002). Pityriacitrin -- an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* **294**, 131-134.
- Mayser, P., Stapelkamp, H., Krämer, H.J., Podobinska, M., Wallbott, W., Irlinger, B., und Steglich, W. (2003). Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**, 185-191.
- Mayser, P., Wenzel, M., Krämer, H.J., Kindler, B.L., Spitteller, P., und Haase, G. (2007). Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med Mycol* **45**, 519-524.
- McLean, L., Soto, U., Agama, K., Francis, J., Jimenez, R., Pommier, Y., Sowers, L., und Brantley, E. (2008). Aminoflavone induces oxidative DNA damage and reactive oxidative species-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Int J Cancer* **122**, 1665-1674.
- Mendgen, K., und Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* **7**, 352-356.
- Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Cornelissen, B.J., und Rep, M. (2008). Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol* **10**, R4.
- Michielse, C.B., und Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* **10**, 311-324.
- Miean, K.H., und Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem* **49**, 3106-3112.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., und Salgado, I. (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol* **130**, 1288-1297.
- Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J.M., Garre, V., Torres-Martinez, S., und Ruiz-Vazquez, R.M. (2007). Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *J Biol Chem* **282**, 15394-15403.
- Murdock, D., Ensley, B.D., Serdar, C., Thalen, M. (1993). Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **11**, 381-386.
- Nakatani, S., Naoe, A., Yamamoto, Y., Yamauchi, T., Yamaguchi, N., und Ishibashi, M. (2003). Isolation of bisindole alkaloids that inhibit the cell cycle from Myxomycetes *Arcyria ferruginea* and *Tubifera casparyi*. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 2879-2881.
- Nebert, D.W., und Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **6**, 947-960.
- Nicholson, R.L., Kollipara, S.S., Vincent, J.R., Lyons, P.C., und Cadena-Gomez, G. (1987). Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5520-5524.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., und von Heijne, G. (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**, 581-599.
- Nishizawa, T., Gruschow, S., Jayamaha, D.H., Nishizawa-Harada, C., und Sherman, D.H. (2006). Enzymatic assembly of the bis-indole core of rebeccamycin. *J Am Chem Soc* **128**, 724-725.
- Oberg, M., Bergander, L., Hakansson, H., Rannug, U., und Rannug, A. (2005). Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol Sci* **85**, 935-943.
- O'connor, K.E., Dobson, A.D., Hartmans, S. (1997). Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4287-4291.
- O'connor, K.E.H., S. (1998). Indigo formation by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Biotechnology Letters* **20**, 219-223.

- Okey, A.B., Riddick, D.S., und Harper, P.A. (1994). Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* **15**, 226-232.
- Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y., und Furumai, T. (2003). Characterization of the biosynthetic gene cluster of rebeccamycin from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 127-138.
- Oxford, G.S., und Gillespie, R.G. (1998). Evolution and ecology of spider coloration. *Annu Rev Entomol* **43**, 619-643.
- Palme, K., und Nagy, F. (2008). A new gene for auxin synthesis. *Cell* **133**, 31-32.
- Paris, C.G., und Magasanik, B. (1981). Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **145**, 266-271.
- Pedras, M.S., Okanga, F.I., Zaharia, I.L., und Khan, A.Q. (2000). Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* **53**, 161-176.
- Pemberton, R.M., Smythies, L.E., Mountford, A.P., und Wilson, R.A. (1991). Patterns of cytokine production and proliferation by T lymphocytes differ in mice vaccinated or infected with *Schistosoma mansoni*. *Immunology* **73**, 327-333.
- Piepenbring, M. (2001). Smut fungi (Ustilaginomycetes and Microbotryales, Basidiomycota) in Panama. *Rev Biol Trop* **49**, 411-428.
- Pisarev, A.V., Kolupaeva, V.G., Pisareva, V.P., Merrick, W.C., Hellen, C.U., und Pestova, T.V. (2006). Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes Dev* **20**, 624-636.
- Politi, V., De Luca, G., Di Stazio, G., und Materazzi, M., inventors. (1992). Cosmetic use of 3-indolepyruvic acid.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., und Genin, S. (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 538-550.
- Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A., und Wood, W.B. (1998). *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2844-2849.
- Rannug, U., Rannug, A., Sjoberg, U., Li, H., Westerholm, R., und Bergman, J. (1995). Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* **2**, 841-845.
- Rehmany, A.P., Gordon, A., Rose, L.E., Allen, R.L., Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Kamoun, S., Tyler, B.M., Birch, P.R., und Beynon, J.L. (2005). Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* **17**, 1839-1850.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R., und Basse, C.W. (2008). Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* **9**, 339-355.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K.Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., und Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5638-5643.
- Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., und Cornelissen, B.J. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol* **53**, 1373-1383.
- Riederer, B., Han, M., und Keller, U. (1996). D-Lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J Biol Chem* **271**, 27524-27530.
- Roper, M.C., Greve, L.C., Labavitch, J.M., und Kirkpatrick, B.C. (2007). Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7252-7258.
- Rose, J.K., Ham, K.S., Darvill, A.G., und Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* **14**, 1329-1345.
- Russell, G.A., und Kaupp, G. (1969). Oxidation of carbanions. IV. Oxidation of indoxyl to indigo in basic solutions. *J Am Chem Soc* **91**, 3851-3859.
- Ryan, K.S., Balibar, C.J., Turo, K.E., Walsh, C.T., und Drennan, C.L. (2008). The violacein biosynthetic enzyme VioE shares a fold with lipoprotein transporter proteins. *J Biol Chem* **283**, 6467-6475.
- Ryan, K., und Drennan, C. (2009). Divergent Pathways in the Biosynthesis of Bisindole Natural Products. *Chemistry & Biology* **16**, 351-364.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn. (Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez, C., Zhu, L., Brana, A.F., Salas, A.P., Rohr, J., Mendez, C., und Salas, J.A. (2005). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 461-466.

- Sanchez, C., Mendez, C., und Salas, J.A.** (2006). Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. *Nat Prod Rep* **23**, 1007-1045.
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J.J., und Constable, J.D.** (2006). Dioxins: an overview. *Environ Res* **101**, 419-428.
- Schirawski, J., Bohnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., und Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schneider, P., Weber, M., Rosenberger, K., und Hoffmeister, D.** (2007). A one-pot chemoenzymatic synthesis for the universal precursor of antidiabetes and antiviral bis-indolylquinones. *Chem Biol* **14**, 635-644.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A., und Glawischnig, E.** (2006). CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**, 1248-1254.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., und Kahmann, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Sergeeva E, L.A., Bergman B.** (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* **215**, 229-238.
- Shan, W., Cao, M., Leung, D., und Tyler, B.M.** (2004). The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 394-403.
- Snetselaar, K.M., und Tiffany, H.L.** (1990). Light and electron microscopy of sorus development in *Sorosporium provinciale*, a smut of big bluestem. *Mycologia* **82**, 480-492.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* **347-355**.
- Snyder, B.A., und Nicholson, R.L.** (1990). Synthesis of Phytoalexins in *Sorghum* as a Site-Specific Response to Fungal Ingress. *Science* **248**, 1637-1639.
- Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M., und Vanderleyden, J.** (2005). *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1803-1810.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., und Remans, R.** (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 425-448.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G., und Alonso, J.M.** (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177-191.
- Stoll, M., Begerow, D., und Oberwinkler, F.** (2005). Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycol Res* **109**, 342-356.
- Strader, L.C., und Bartel, B.** (2008). A new path to auxin. *Nature Chemical Biology* **4**, 337 - 339.
- Summers, K.M., und Howells, A.J.** (1978). Xanthommatin biosynthesis in wild-type and mutant strains of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Biochem Genet* **16**, 1153-1163.
- Sung, M.H., Tanizawa, K., Tanaka, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Hirotsu, K., Okamoto, A., Higuchi, T., und Soda, K.** (1991). Thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. Gene cloning, sequence determination, and preliminary x-ray characterization. *J Biol Chem* **266**, 2567-2572.
- Suzuki, T., Tsuzuki, A., Ohno, N., Ohshima, Y., und Yadomae, T.** (2000). Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lines, THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**, 157-162.
- Swanson, H.I., und Bradfield, C.A.** (1993). The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* **3**, 213-230.
- Tanaka, A., und Tsuge, T.** (2000). Structural and functional complexity of the genomic region controlling AK-toxin biosynthesis and pathogenicity in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 975-986.
- Tang, H.L., Yeh, L.S., Chen, N.K., Ripmaster, T., Schimmel, P., und Wang, C.C.** (2004). Translation of a yeast mitochondrial tRNA synthetase initiated at redundant non-AUG codons. *J Biol Chem* **279**, 49656-49663.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P., und Chory, J.** (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164-176.
- Tauchi, M., Hida, A., Negishi, T., Katsuoka, F., Noda, S., Mimura, J., Hosoya, T., Yanaka, A., Aburatani, H., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H., und Yamamoto, M.** (2005). Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol Cell Biol* **25**, 9360-9368.

- Teale, W.D., Paponov, I.A., und Palme, K.** (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 847-859.
- Thoma, W., Krämer, H.J., und Mayser, P.** (2005). Pityriasis versicolor alba. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **19**, 147-152.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P., und Thevissen, K.** (2003). Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**, 1-8.
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., und Kamoun, S.** (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* **279**, 26370-26377.
- Tian, M., Benedetti, B., und Kamoun, S.** (2005). A Second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* **138**, 1785-1793.
- Tsai, H.F., Wang, H., Gebler, J.C., Poulter, C.D., und Schardl, C.L.** (1995). The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 119-125.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., und Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **98**, 1304-1309.
- Tudzynski, P., Hölter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N., und Keller, U.** (1999). Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol Gen Genet* **261**, 133-141.
- Tudzynski, P., Correia, T., und Keller, U.** (2001). Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**, 593-605.
- Tuori, R.P., Wolpert, T.J., und Ciuffetti, L.M.** (1995). Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 41-48.
- Tuori, R.P., Wolpert, T.J., und Ciuffetti, L.M.** (2000). Heterologous expression of functional *Ptr ToxA*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 456-464.
- Uno, S., Dalton, T.P., Sinclair, P.R., Gorman, N., Wang, B., Smith, A.G., Miller, M.L., Shertzer, H.G., und Nebert, D.W.** (2004). *Cyp1a1*(-/-) male mice: protection against high-dose TCDD-induced lethality and wasting syndrome, and resistance to intrahepatocyte lipid accumulation and uroporphyrin. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 410-421.
- Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, I., und Grenson, M.** (1998). Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol Gen Genet* **257**, 230-237.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M.V., Colmenero-Varea, P., Del Rio, L.A., und Barroso, J.B.** (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* **581**, 453-461.
- van der Biezen, E.A., und Jones, J.D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-456.
- van der Does, H.C., und Rep, M.** (2007). Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1175-1182.
- van der Does, H.C., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P.M., Cornelissen, B.J., und Rep, M.** (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environ Microbiol* **10**, 1475-1485.
- Veselova, M., Kholmeckaya, M., Klein, S., Voronina, E., Lipasova, V., Metlitskaya, A., Mayatskaya, A., Lobanok, E., Khmel, I., und Chernin, L.** (2003). Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* **48**, 794-798.
- Vlassis, A.A., Bartos, D., und Trunkey, D.** (1990). Importance of spontaneous alpha-ketoacid decarboxylation in experiments involving peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* **170**, 1281-1287.
- Vogler, H., und Kuhlmeier, C.** (2003). Simple hormones but complex signalling. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 51-56.
- Vogliardi, S., Bertazzo, A., Comai, S., Costa, C.V.L., Allegri, G., Seraglia, R., und Traldi, P.** (2004). An investigation on the role of 3-hydroxykynurenine in pigment formation by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 1413-1420.
- Von Bodman, S.B., Bauer, W.D., und Coplin, D.L.** (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 455-482.
- von Nussbaum, F.** (2003). Stephacidin B-A new stage of complexity within prenylated indole alkaloids from fungi. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 3068-3071.
- Walzel, B., Riederer, B., und Keller, U.** (1997). Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem Biol* **4**, 223-230.

- Wang, L., Li, Z., Wang, C., Yang, Y., Sun, L., Yao, W., Cai, X., Wu, G., Zhou, F., and Zha, X. (2009). E-cadherin decreased human breast cancer cells sensitivity to staurosporine by up-regulating Bcl-2 expression. *Arch Biochem Biophys* **481**, 116-122.
- Watanabe, S., Kano, R., Sato, H., Nakamura, Y., and Hasegawa, A. (2001). The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**, 769-773.
- Wegrzyn, J.L., Drudge, T.M., Faramarz, V., and Hook, V. (2007). Bioinformatic analyses of mammalian 5'-UTR sequence properties of mRNAs predicts translation initiation sites. *BMC Bioinformatics* **9**.
- Wei, Y.D., Helleberg, H., Rannug, U., and Rannug, A. (1998). Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact* **110**, 39-55.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L., and Birch, P.R. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115-118.
- Wille, G., Mayser, P., Thoma, W., Monsees, T., Baumgart, A., Schmitz, H.J., Schrenk, D., Polborn, K., and Steglich, W. (2001). Malassezin--A novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorg Med Chem* **9**, 955-960.
- Williams, S.J., Senaratne, R. H., Mougous, J. D., Riley, L. W. & Bertozzi, C. R. (2002). 5'-Adenosinephosphosulfate Lies at a Metabolic Branch Point in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, 32606-32615.
- Wolf, F. (1952). The Production of Indole Acetic Acid by *Ustilago zeae*, and Its Possible Significance in Tumor Formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **38**, 106-111.
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond)* **95**, 707-735.
- Wroblewski, N., Bar, S., and Mayser, P. (2005). [Missing granulocytic infiltrate in pityriasis versicolor--indication of specific anti-inflammatory activity of the pathogen?]. *Mycoses* **48**, 66-71.
- Xu, C., Li, C.Y., and Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **28**, 249-268.
- Xu, W., Charles, I.G., and Moncada, S. (2005). Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Res* **15**, 63-65.
- Yen, K.M., Karl, M.R., Blatt, L.M., Simon, M.J., Winter, R.B., Fausset, P.R., Lu, H.S., Harcourt, A.A., and Chen, K.K. (1991). Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J Bacteriol* **173**, 5315-5327.
- Yu, C.K., Springob, K., Schmidt, J., Nicholson, R.L., Chu, I.K., Yip, W.K., and Lo, C. (2005). A stilbene synthase gene (SbSTS1) is involved in host and nonhost defense responses in sorghum. *Plant Physiol* **138**, 393-401.
- Zaffarano, P.L., McDonald, B.A., and Linde, C.C. (2008). Rapid speciation following recent host shifts in the plant pathogenic fungus *Rhynchosporium*. *Evolution* **62**, 1418-1436.
- Zhang, S., Monahan, B.J., Tkacz, J.S., and Scott, B. (2004). Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6875-6883.
- Zhao, J., and Last, R.L. (1996). Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**, 2235-2244.
- Zook, M., and Hammerschmidt, R. (1997). Origin of the thiazole ring of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **113**, 463-468.
- Zook, M. (1998). Biosynthesis of camalexin from tryptophan pathway intermediates in cell-suspension cultures of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**, 1389-1393.

LEBENS LAUF

Katja Zuther

Geboren am 11.08.1978 in Osnabrück

SCHULAU SBILDUNG

1984 – 1988	Grundschule
1988 – 1990	Orientierungsstufe
1990 – 1997	Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Wilhelmshaven mit Abschluss Abitur

STUDIUM

1997 – 2004	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen mit Vertiefung in Humangenetik, Pharmakologie und Zoologie
2000 – 2001	Studium der Biologie an der Universität Birmingham im Rahmen eines Erasmus-Programmes
2003 – 2004	Diplomarbeit durchgeführt an der Georg-August-Universität Göttingen, Institut für Humangenetik (Prof. Dr. W. Engel) zum Thema „Molekulargenetische Analysen bei Patienten mit Deletionssyndrom 2q“
2004 – 2005	Studium der Bioinformatik an der Universität Bielefeld

PROMOTION

2005 – heute	Doktorarbeit an der Philipps-Universität Marburg, durchgeführt am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abt. Organismische Interaktionen, betreut durch Dr. Jan Schirawski zum Thema „Tryptophanabhängige Pigmentsynthese in <i>Ustilago maydis</i> “ und „Identifizierung von Wirtsspezifitätsfaktoren in den Brandpilzen <i>Ustilago maydis</i> und <i>Sporisorium reilianum</i> “
--------------	---

Mitglied der *International Max Planck Research School* des Max-Planck-Instituts, Marburg.

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Regine Kahmann danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit die Arbeiten zur Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese in ihrer Abteilung durchführen und dank ihrer Unterstützung auch beenden zu können und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz großer Dank gilt meinem hervorragenden Betreuer, Dr. Jan Schirawski, der mich unentwegt motiviert und unterstützt hat. Es macht immer jede Menge Spaß, in seiner Gruppe arbeiten zu dürfen und mit ihm über wissenschaftliche Fragestellungen zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. Michael Bölker danke ich sehr herzlich für die Bereitschaft, das Erstgutachten zu erstellen, die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung von Beginn meiner Arbeit an.

Ein herzlicher Dank gilt den weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel und Herrn Prof. Dr. Andreas Brune.

Herrn Prof. Dr. Peter Mayser danke ich für die Möglichkeit, an dem Thema zur Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese arbeiten zu dürfen, sowie für die gute Kooperation. Die vielen Seminare an der Hautklinik in Gießen waren durch ihre Praxisbezogenheit immer besonders spannend.

Ich danke den Mitgliedern meines „IMPRS-Advisory-Committees“, Herrn Prof. Dr. Rolf Thauer, Herrn Dr. Jan Schirawski, Herrn Prof. Dr. Bölker und Herrn PD Dr. Rainer Hedderich, die sich sehr kritisch und intensiv mit meinem Thema auseinandergesetzt haben und mir sehr viele wertvolle Tipps mitgegeben haben.

Herrn Prof. Dr. Karlovsky und Frau Dr. Ursula Hettwer danke ich für die tolle und erfolgreiche Kooperation, die meine Arbeit überhaupt erst machbar werden lassen.

Einen allerherzlichsten Dank möchte ich den tollen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe aussprechen. Britta Winterberg, Elmar Meyer, Hassan Ghareeb, Theresa Wollenberg, Bernie Heinze, Christoph Hahne, Mascha Valevich, Helen Hülsmann, Dominic Cimiotti, Julia Zielecki, Marco Coelho, Gustavo Gamez, Ronny Kellner, Stephan Poppe, Stefanie Uhlmann und Christine Platzer waren und sind einfach superklasse Kollegen und Freunde! Britta ist zu einer guten Freundin geworden. Bei Elmar Meyer, Theresa Wollenberg, Maria Valevich, Stephan Poppe und Christine Platzer möchte ich mich außerdem für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Jörg Kahnt gilt ein besonderes Dankeschön für die Zeit, die er sich genommen hat, um Substanzen von mir mit MALDI-TOF zu analysieren und die stete Bereitschaft zu helfen.

Herrn Prof. Lohoff danke ich für die Möglichkeit, bei ihm die Zellkultur zu erlernen und durchzuführen und das rege Interesse während meines Seminars. Auch Katharina Reinhard gilt hierbei ein ganz besonderes Dankeschön!

Danke allen Kollegen aus dem Institut, die das Leben im Institut außerordentlich angenehm gemacht haben. Auch der AG Bölker möchte ich für die ständige Unterstützung und die lustige Zeit während meiner Arbeit danken.

Meinem Freund danke ich für seine Ausgeglichenheit und sein Verständnis für Laborangelegenheiten. Meinen drei besten Freundinnen aus Berlin, Stuttgart und Sundsvall danke ich ganz besonders dafür, dass sie trotz der recht großen Distanz den Kontakt aufrechterhalten haben. Zuletzt danke ich meinen Eltern, die immer bereit waren, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Ganz lieben Dank dafür!